

**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLACENTA DE 16.5 DÍAS DE
GESTACIÓN PROVENIENTE DE RATAS CON OBESIDAD PRE GESTACIONAL**

YHOISS SMIHT MUÑOZ CERÓN
Estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas

**Universidad del Valle
Escuela de Ciencias Básicas
Departamento de Morfología
Santiago de Cali
2018**

**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLACENTA DE 16.5 DÍAS DE
GESTACIÓN PROVENIENTE DE RATAS CON OBESIDAD PRE GESTACIONAL**

YHOISS SMIHT MUÑOZ CERÓN

Bacterióloga y Laboratorista Clínico
Estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas

MARÍA CAROLINA PUSTOVRH RAMOS

PhD En Ciencias Biológicas

LILIANA SALAZAR MONSALVE

MSc en Morfología

Tutores

**Universidad del Valle
Escuela de Ciencias Básicas
Departamento de Morfología
Santiago de Cali
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN

El jurado calificador del trabajo de investigación titulado:

“CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLACENTA DE 16.5 DÍAS DE GESTACIÓN PROVENIENTE DE RATAS CON OBESIDAD PRE GESTACIONAL” considera que está estructurado conforme al rigor académico y normas que para estos fines tiene la Universidad del Valle. Por lo anterior conceptúa lo siguiente

Presidente:

Jurado 1:

Jurado 2:

Jurado 3:

Ciudad y fecha _____

DEDICATORIA

Dedico este logro a mi madre, Miriam Cerón, a mi padre Herney Muñoz, a mis hermanos Andrea Muñoz y Herney Muñoz, a mis tías, abuelos, primos y toda mi familia, quienes me apoyaron y siempre estuvieron impulsándome para alcanzar este nuevo logro en mi vida. A mis amigos por su comprensión. A Carlos Quilindo, por el apoyo incondicional en los momentos más difíciles. A mi familia de corazón, Teblami quienes han colaborado con mi formación académica y personal.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Humberto Carvajal por motivarme a ingresar a la maestría en Ciencias Biomédicas, aunque no esté entre nosotros, siempre será alguien importante en mi vida.

Estaré siempre agradecida con la profesora Liliana Salazar por permitirme entrar al campo de la investigación, por todos los consejos, la motivación, la dedicación, el interés en mi formación, quien siempre será una mujer ejemplar, la cual es responsable de la formación de gran parte de mi carácter.

Agradezco a la Doctora Carolina Pustovrh por todo el apoyo brindado a mi formación académica y personal, por ser más que una tutora, por ser mi amiga, mi familia.

A Martha Lucia Ceballos, Nhora Holguín y Gustavo Villa por la ayuda incondicional, por compartir sus experiencias y conocimientos.

A mis compañeros e integrantes del grupo de investigación TEBLAMI quienes enriquecieron las presentaciones del trabajo, con comentarios y sugerencias.

A las personas que compartieron el desarrollo de la investigación, María Eleonora Tejada López, Sirsa Aleida Hidalgo, Farah El-Sharkawy, Carlos Andrés Muñoz y David Moreno.

A mis compañeros Diana Betancourt, Jenniffer Castellanos, Ana María Soria, Luis Felipe Falla, Lina Paredes, Sindy Bula y Andrés Tangua, quienes hicieron del ambiente académico, un ambiente familiar.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	12
2. INTRODUCCIÓN.....	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. MARCO TEÓRICO	20
5.1 Obesidad	20
5.1.1 Epidemiología.....	20
5.1.2 Obesidad y gestación	21
5.2 Placenta.....	21
5.2.1 Formación de la placenta	22
5.2.2 Comparativo entre la placenta humana y murina	25
5.3 Placenta y obesidad	27
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
7. OBJETIVOS	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos	31
8. DISEÑO METODOLÓGICO	32
8.1 Tipo de estudio	32
8.2 Unidad de análisis	32
8.3 Consideraciones éticas.....	32
8.4 Protocolo de trabajo	33
8.4.1 Biomodelo de obesidad	33
8.4.2 Obtención de las muestras.....	35
9. MÉTODOS Y RESULTADOS.....	36
I. EVALUACIÓN DE LAS DIMENSIONES MACROSCÓPICAS DE LA PLACENTA	36
1. Unidad de análisis	36
2. Criterio de inclusión	36
3. Criterio de exclusión	36
4. Protocolo de trabajo	37

4.1 Variables	37
4.2 Prueba intra e interobservador	38
4.3 Análisis estadístico	39
5. Resultados	39
II. CARACTERIZACIÓN HISTO-MORFOLÓGICA DE LA PLACENTA DE RATA	43
1. Unidad de análisis	43
2. Criterio de inclusión	43
3. Criterio de exclusión	43
4. Protocolo de trabajo	43
4.1 Técnica histoquímica	43
4.2 Observación histológica de las muestras	44
4.3 Captura y reconstrucción de imágenes.....	44
4.4 Variables	44
4.5 Prueba intra e interobservador	45
4.6 Análisis estadístico	47
5. Resultados	47
5.1 Descripción histológica de la placenta de 16.5 dg	47
5.2 Evaluación de las dimensiones microscópicas de la placenta	60
III. RECUENTO DE VASOS FETALES EN EL LABERINTO PLACENTARIO	62
1. Unidad de análisis	62
2. Criterio de inclusión	62
3. Criterio de exclusión	62
4. Protocolo de trabajo	62
4.1 Técnica inmunohistoquímica	62
4.2 Captura y reconstrucción de imágenes	62
4.3 Variables	63
4.4 Prueba intra e interobservador	65
4.5 Análisis estadístico	66
5. Resultados	66
10. DISCUSIÓN	69
11. CONCLUSIÓN	77
12. PERSPECTIVAS	78

REFERENCIAS	79
ANEXOS.....	87
DIVULGACIÓN.....	159

LISTAS ESPECIALES

TABLAS

Tabla 1. Alimentos suministrados a los biomodelos maternos durante la dieta de cafetería	34
Tabla 2. Variables macroscópicas analizadas	37
Tabla 3. Prueba intraobservador de las variables macroscópicas.....	38
Tabla 4. Prueba interobservador de las variables macroscópicas.....	39
Tabla 5. Variables microscópicas analizadas	44
Tabla 6. Prueba intraobservador de las variables placentarias microscópicas	46
Tabla 7. Prueba interobservador de las variables placentarias microscópicas	47
Tabla 8. Variables: Recuento de vasos fetales por campo y área.....	64
Tabla 9. Prueba intraobservador de la variable, número de vasos fetales por campo de laberinto placentario.....	65
Tabla 10. Prueba interobservador de la variable, número de vasos fetales por campo de laberinto placentario.....	66
Tabla 11. Comportamiento del peso placentario respecto al grupo control, en estudios de los efectos de la obesidad sobre la placenta	71
Tabla 12. Comportamiento de las variables microscópicas respecto al grupo control, en estudios de los efectos de la obesidad sobre la placenta.	73
Tabla 13. Protocolos de inducción de obesidad materna	74

FIGURAS

Figura 1: Estructura placentaria murina.	24
Figura 2: Circulación de la sangre materna en la placenta murina.	25
Figura 3: Componentes de la barrera placentaria.....	26
Figura 4: Invasión de las arterias espirales en humanos y murinos.....	27
Figura 5: Acta de aval del Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales de Experimentación.	33
Figura 6: Ubicación de placentas en el útero.	36
Figura 7: Mediciones macroscópicas de la placenta de 16.5 dg usando calibrador digital.	38
Figura 8: Comparación del peso placentario entre el grupo control y obeso.	40
Figura 9: Comparación del diámetro mayor placentario entre el grupo control y obeso.....	40
Figura 10: Comparación del diámetro menor placentario entre el grupo control y obeso.....	41

Figura 11: Comparación del grosor placentario central entre el grupo control y obeso.	41
Figura 12: Comparación del área de superficie placentaria de la cara fetal entre el grupo control y obeso.	42
Figura 13: Comparación del volumen placentario entre el grupo control y obeso.	42
Figura 14: Representación de la medidas microscópicas placentarias.	45
Figura 15: Placenta de rata 16.5 dg.	49
Figura 16: Constitución histológica de la placa coriónica y organización de la zona del laberinto.	50
Figura 17: Componentes histológicos de la zona de laberinto.	51
Figura 18: Ubicación y componentes celulares de la zona unión.	52
Figura 19: Espongiotrofoblastos de la zona de unión.	53
Figura 20: Células glucogénicas de la zona de unión.	54
Figura 21: Células trofoblásticas gigantes de la zona de unión.	55
Figura 22: Células de la decidua materna.	56
Figura 23: Zona de laberinto. Comparación entre el grupo control y obeso.	57
Figura 24: Zona de unión. Comparación entre el grupo control y obeso.	58
Figura 25: Placa coriónica. Comparación entre el grupo control y obeso.	59
Figura 26: Comparación del grosor central placentas grupo control y grupo obesas.	60
Figura 27: Comparación del grosor central de la zona de laberinto en placentas grupo control y obeso.	60
Figura 28: Comparación del área placentaria grupo control y obeso.	61
Figura 29: Comparación del área del laberinto placentario grupo control y obeso.	61
Figura 30: Distribución de los campos en la zona del laberinto de las placentas inmunomarcadas.	63
Figura 31: Recuento de vasos fetales usando la herramienta “multi point” de Image-J.	65
Figura 32: Inmunomarcación de vasos fetales con anti-CD31/ α -actina. Comparación entre grupos.	67
Figura 33: Comparación del número de vasos fetales por campo de laberinto placentario grupo control y obeso.	68
Figura 34: Comparación del número de vasos fetales por área de laberinto placentario grupo control y obeso.	68

ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo para la disección del útero y obtención de placenta de rata Wistar.	87
ANEXO 2: Protocolo para el análisis macroscópico de la placenta de rata Wistar.	98
ANEXO 3: Protocolo procesamiento histoquímico de la placenta de rata Wistar.	102
ANEXO 4: Protocolo para la captura y reconstrucción de imágenes placentarias - uso del programa lasv4.7 y la aplicación Image Builder (LIB)	112

ANEXO 5: Protocolo para la realización de medidas placentarias con image-pro plus	126
ANEXO 6: Protocolo para la realización de marcación con anti- PECAM1/CD31 en combinación con anti- α -actina	135
ANEXO 7: Protocolo para la reconstrucción de imágenes placentarias	141
ANEXO 8: Protocolo para el recuento de vasos fetales en la zona del laberinto	154

1. RESUMEN

En los últimos años la obesidad en mujeres gestantes se ha incrementado y se asocia con el desarrollo de complicaciones para el feto, la madre y el neonato, como restricción intrauterina del crecimiento, muerte fetal, macrosomía, diabetes gestacional, pre eclampsia, parto instrumentado, entre otras.

El análisis de la placenta es clave para entender el desarrollo de estas complicaciones, pues es considerado el órgano regulador del ambiente intrauterino y la adecuada función placentaria representa un punto clave para el embarazo exitoso. Recientes estudios histopatológicos realizados en placentas humanas procedentes de mujeres obesas reportan, inmadurez vellosa, corangiosis, lesiones inflamatorias, escasa arborización y aumento de músculo liso en la vasculatura, entre otros. Esto hallazgos se asocian con aumento de riesgo para el desarrollo de insuficiencia placentaria.

Los estudios en modelos murinos muestran la presencia de variaciones en el peso y grosor del órgano placentario en el grupo obeso, también muestran diferencias en el desarrollo de las zonas placentarias, sin embargo estos estudios resultan contradictorios y poco concluyentes. Para profundizar en el impacto de la obesidad materna sobre la placenta, el objetivo de este trabajo fue caracterizar morfológicamente la placenta de 16.5 días de gestación (dg) proveniente de ratas con obesidad pre-gestacional adquirida por dieta de cafetería.

En este estudio experimental se emplearon ocho (8) ratas Wistar adultas, grupo control (CTROL; n=4), alimentado con dieta estándar y grupo experimental (CAF; n=4), alimentado con dieta estándar más dieta de cafetería. Después de seis semanas de alimentación, se aparearon; cumplidos 16,5 dg se sacrificaron y explantaron sus placentas. Fueron seleccionadas 27 placentas: 16 CTROL y 11 CAF, bajo criterios de inclusión previamente establecidos; a ellas se les realizaron mediciones macroscópicas; posteriormente se procesaron para técnica histoquímica, se realizó la caracterización histológica y las mediciones microscópicas.

En análisis de las variables macroscópicas placentarias, peso, grosor central, diámetro mayor, diámetro menor, área de superficie y volumen placentario, no presentaron diferencias significativas entre los grupos analizados, tampoco las variables microscópicas, grosor placentario, grosor zona de laberinto, área placentaria y área zona de laberinto.

La placenta de 16.5 dg, presentó tres (3) zonas histológicamente diferenciadas: zona de laberinto, zona de unión y decidua. En la zona de laberinto, se observaron vasos fetales, vellosidades y lagunas maternas; en la zona de unión, se ubicaron tres (3) tipos de células, espongiotrofoblastos, células glucogénicas y células trofoblásticas gigantes; en la decidua se observaron, células deciduales y mocitos lisos. Ambos grupos analizados presentaron escasos depósitos fibrinoides cerca de la placa coriónica y en la decidua.

El recuento de vasos sanguíneos por campo y por área de zona del laberinto reveló un aumento de la densidad de vasos vellositarios en el grupo CAF en comparación con el grupo CTROL.

Bajo las condiciones experimentales de este estudio, la obesidad inducida por dieta no afecta la constitución histo-morfológica placentaria en el día gestacional 16.5, sin embargo induce un incremento en el número de vasos en las vellosidades placentarias lo que indicaría una disfunción placentaria relacionada con el transporte de nutrientes y oxígeno hacia el feto.

2. INTRODUCCIÓN

Este trabajo corresponde al informe final de la investigación “Características morfológicas de placenta de 16.5 días de gestación proveniente de ratas con obesidad pre gestacional”, enmarcada dentro de la línea de investigación de Biología del desarrollo del grupo Teblami, tejidos blandos y mineralizados. Este estudio se realizó dentro de la formación de la Maestría en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle.

El propósito de este trabajo fue mostrar los efectos de la obesidad sobre la histomorfometría placentaria en un estadio tardío de la gestación, utilizando un modelo con obesidad adquirida por dieta de cafetería. La dieta de cafetería se caracteriza por el consumo de alimentos empacados o ultraprocesados, que se asemeja a la dieta del ser humano del mundo occidental, por lo cual es un modelo interesante para estudios de los efectos de la obesidad sobre el órgano placentario.

La obesidad es catalogada como la acumulación excesiva de grasa, debido a un desbalance entre las calorías ingeridas y el gasto calórico; el aumento de tejido adiposo genera un estado inflamatorio alterado. En los últimos años la obesidad en mujeres gestantes se ha incrementado y se ha asociado con el desarrollo de complicaciones para el feto, la madre y el neonato, como restricción intrauterina del crecimiento, muerte fetal, macrosomía, diabetes gestacional, pre eclampsia, parto instrumentado, entre otras (1–3).

El análisis de la placenta es clave para entender el desarrollo de estas complicaciones, pues es considerado como el órgano regulador del ambiente intrauterino, es así que la adecuada función placentaria representa un punto clave para un embarazo exitoso. La función placentaria depende de las propiedades intrínsecas de la placenta, como tamaño, sistemas de transporte, ultraestructura, superficie de intercambio, el grado de vascularización y la síntesis de hormonas; así como también de las propiedades extrínsecas, como estado nutricional, situación endocrina y metabolismo materno (4).

En este trabajo se caracterizó macroscópicamente la placenta, mediante las mediciones de peso, grosor central, diámetro mayor y menor, área de superficie y volumen placentario. Se analizó la histomorfometría placentaria, empleando muestras histológicas de cuatro (4) micras de grosor teñidas con hematoxilina-eosina, este análisis incluyó, mediciones del grosor central de la placenta, grosor central de la zona del laberinto, área total placentaria y área total de la zona del laberinto. Además se realizó la marcación de vasos sanguíneos en el laberinto

placentario mediante técnica de inmunohistoquímica, con el fin de determinar la densidad de vasos fetales en la zona del laberinto.

La información relacionada con los métodos usados y los resultados obtenidos se presentan por cada objetivo específico, en el siguiente orden: I) Evaluación de las dimensiones macroscópicas de la placenta; II) Descripción histológica de la placenta y evaluación de las dimensiones microscópicas placentarias y III) Recuento del número de capilares coriónicos presentes en el laberinto placentario.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad y el sobrepeso previo al embarazo, así como la ganancia excesiva de peso durante la gestación, son factores negativos relacionados con complicaciones para la gestante, el feto y neonato. La creciente tasa de obesidad materna se ha convertido en un reto para la práctica obstétrica, dado que estas pacientes son catalogadas de alto riesgo.

La obesidad durante la gestación puede provocar complicaciones tales como diabetes gestacional, hipertensión y pre eclampsia, procesos de enfermedad que inciden sobre el adecuado crecimiento fetal. A partir de modelos animales y estudios en humanos se ha sugerido que la obesidad materna también crea un ambiente uterino adverso, el cual a largo plazo tiene consecuencias sobre la descendencia, teniendo importantes implicaciones en el establecimiento de enfermedades metabólicas, cardíacas e hipertensión en el adulto (5,6).

En la actualidad, existen pocas evidencias sobre los mecanismos por los cuales la obesidad materna genera alteraciones en la descendencia. Sin embargo, dado que la placenta es el regulador del ambiente intrauterino, se considera el órgano clave para el establecimiento de estas alteraciones.

La placenta constituye la interfase entre la madre y el feto, entre sus funciones principales, están la protección del feto en crecimiento, el intercambio de nutrientes y desechos, la producción de hormonas. Por este motivo, una adecuada función placentaria representa un punto clave para un embarazo exitoso, dado que constituye “el puente” de comunicación entre la circulación materno-fetal, y está expuesta a todas las variables que pueda afectar el desarrollo del embarazo(7).

4. JUSTIFICACIÓN

La obesidad está definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa que es perjudicial para la salud, y en la actualidad es considerada una epidemia a nivel mundial. Según la OMS 1900 millones de personas en el mundo tienen sobrepeso y 650 millones son obesos (1). Si bien en un principio, la obesidad era una condición asociada a los países ricos e industrializados, el panorama ha cambiado y hoy en día la obesidad se ha convertido en una realidad para los países pobres y en vías de desarrollo. En Latinoamérica, 130 millones de personas (un cuarto de la población) están afectadas por sobrepeso u obesidad, lo que genera una pesada carga para los sistemas de salud (8). Según datos recogidos entre los años 2005 y 2013 por las encuestas demográficas y de salud urbanas, revelan que en países del Caribe y Latinoamérica, más del 50 % de las mujeres en edad reproductiva padecen de obesidad (2).

La proliferación de dietas poco saludables y con exceso de calorías, el escaso ejercicio y los estilos de vida sedentarios, han provocado que Latinoamérica sea cada vez más obesa. En Colombia, según el último censo nutricional realizado en el 2015, el 56,4% de la población adulta (18 a 64 años) presenta algún grado de sobrepeso y de ellos el 18,7% ya padece de obesidad. La población femenina es la más afectada dado que el 59,5% presenta exceso de peso (9).

Durante el embarazo, el exceso de peso materno se define como obesidad pregestacional si la mujer inicia su embarazo con esta condición, y obesidad gestacional, si la mujer inicia su embarazo con un índice de masa corporal adecuado pero tiene una ganancia excesiva de peso durante el desarrollo del mismo. Evidencias clínicas han demostrado que en ambos casos el exceso de peso durante la gestación puede contribuir a un resultado obstétrico desfavorable, siendo incluso un factor de riesgo la sola presencia de sobrepeso sin llegar a la obesidad (3).

En Colombia, según datos recogidos en la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional (ENSIN, 2010), el 34.6% de las gestantes presentaron exceso de peso para la edad gestacional (10). Un estudio realizado en Cali sobre mortalidad fetal temprana, entre septiembre de 2014 y enero de 2015, analizó 35 % de los casos presentados en el periodo, encontrando que el 18% de las mujeres gestantes presentaron sobrepeso y 16.4 % presentaron obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (11).

En el embarazo, la obesidad incrementa el riesgo materno promoviendo la ocurrencia de trabajo de parto pretérmino, cesárea primaria o parto instrumentado, morbilidad perioperatoria, estados o trastornos hipertensivos del embarazo, preeclampsia, tromboembolismo venoso, diabetes gestacional, ganancia de peso excesiva durante todas las etapas del embarazo, infección puerperal, disminución

de las tasas de iniciación o continuación de la lactancia materna, riesgos con la anestesia perioperatoria (12,13). Están descritos riesgos para el feto como son: mayor probabilidad de muerte intrauterina, macrosomía, restricción del crecimiento intrauterino, anomalías congénitas y neonatales (mayor probabilidad de muerte neonatal) (12,14,15).

Las anomalías congénitas son la principal causa de muerte fetal y de mortalidad infantil. En los últimos años se ha demostrado que la obesidad materna está asociada con el incremento de defectos en la formación del tubo neural, fisuras oropalatinas, defectos del corazón y los grandes vasos, espina bífida y onfalocele (12,15–17). El ambiente obesogénico intrauterino conlleva a cambios a nivel del metabolismo, la regulación hormonal y modificación de la expresión de los genes (epigenética) en el nuevo individuo en desarrollo.

De acuerdo a lo anterior, el ambiente intrauterino adverso generado por la obesidad podría en efecto alterar el desarrollo placentario o generar modificaciones en la zona de intercambio que ocasionarían un aumento en el riesgo de disfunción placentaria, con la consecuente afectación del desarrollo fetal. Por lo expuesto anteriormente, el análisis de la placenta se hace necesario para entender los efectos de la obesidad sobre la gestación, debido al importante papel que juega la placenta como órgano regulador de la comunicación entre madre y feto.

La condición de diabetes ha sido ampliamente estudiada en la placenta, tanto en biomodelos como en placentas provenientes de madres diabéticas. Los resultados de los análisis histopatológicos relacionan la insuficiencia vascular uteroplacentaria con el retraso en el crecimiento intrauterino (18).

La información de los efectos de la obesidad sobre la estructura placentaria sigue siendo escasa y confusa. Existe un número limitado de estudios retrospectivos realizados con placentas humanas y estudios de placentación realizados con biomodelos (19–28); sin embargo son poco concluyentes.

Un mejor entendimiento de los alcances de ésta condición sobre la constitución histológica del órgano placentario puede convertirse en una herramienta potente de predicción del grado de impacto de la sobrenutrición materna sobre la descendencia.

El uso de biomodelos murinos es común en estudios de placentación, puesto que, por condiciones éticas, estudiar la placenta durante la gestación por métodos invasivos no es viable. La rata constituye un adecuado biomodelo para estudiar la formación y maduración de la placenta, debido a la similitud que existe entre la estructura placentaria de la zona de intercambio, entre murinos y humanos permitiendo realizar extrapolaciones (29). Además, el uso de biomodelos permite obtener el estado de obesidad en un ambiente controlado y facilita el análisis de sus efectos sobre el órgano placentario.

Al igual que en humanos, es posible observar que los aportes de resultados obtenidos desde los biomodelos es confuso, lo cual se relaciona con la variedad de

cepas empleadas y los diferentes orígenes de la obesidad (genético y nutricional). Esto refuerza el hecho que siendo la placenta un órgano tan importante en la relación metabólica de la madre y el feto, es necesaria mayor claridad para entender los efectos de la obesidad sobre el desarrollo y maduración de la placenta, así como también las características histomorfológicas de la placenta a término.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Obesidad

Actualmente la obesidad y el sobrepeso, son considerados un problema de Salud Pública convirtiéndose en una epidemia mundial y en la principal causa de las comorbilidades, como la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, varios tipos de cáncer y otros problemas de salud que pueden conducir a una mayor morbilidad y mortalidad (30). La obesidad ha sido definida como la acumulación excesiva que corresponde según la estatura, el sexo y la edad de la persona. Es así que, para el año 2000 la Organización Mundial de la Salud (OMS) le dio estatus de epidemia global, con mayor prevalencia en la población adulta (31). La obesidad se ha incrementado dramáticamente en las últimas décadas, especialmente en el mundo occidental y en países desarrollados, afectando a un mayor número de mujeres que hombres (32).

Con base en el índice de masa corporal (IMC), se estableció la siguiente categorización, peso normal: 18.5–24.9 kg/m², sobrepeso 25–29.9 kg/m², obesidad tipo I entre 30–34.9 kg/m², obesidad tipo II: 35–39.9 kg/m², y obesidad tipo III: 40 kg/m² o más (32).

5.1.1 Epidemiología

Según la OMS, la prevalencia de la obesidad se ha triplicado entre 1975 y 2016, en el 2016, la OMS reportó 1900 millones de personas adultas mayores de 18 años con exceso de peso, dentro de esta población 650 millones padecían de obesidad (1). En Latinoamérica, 130 millones de personas (un cuarto de la población) están afectadas por sobrepeso u obesidad, lo que genera una pesada carga para los sistemas de salud (8). Según datos recogidos entre los años 2005 y 2013 por las encuestas demográficas y de salud urbana, revelan que en países del Caribe y Latinoamérica, más del 50 % de las mujeres en edad reproductiva padecen de obesidad (2).

En Colombia, según datos recogidos en la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional (ENSIN, 2010), el 34.6% de las gestantes presentaron exceso de peso para la edad gestacional (10). Un estudio realizado en Cali sobre mortalidad fetal temprana, entre septiembre de 2014 y enero de 2015, analizó 35 % de los casos presentados en el periodo, encontrando que el 18% de las mujeres gestantes presentaron sobrepeso y 16.4 % presentaron obesidad (IMC \geq 30 kg/m²) (11).

5.1.2 Obesidad y gestación

La obesidad y el sobrepeso previo al embarazo, así como la ganancia excesiva de peso durante la gestación son factores negativos que implican complicaciones para la embarazada, su feto y neonato (33). Por lo cual las pacientes gestantes con obesidad son catalogadas como embarazo de alto riesgo.

La prevalencia de la obesidad materna ha aumentado rápidamente en las últimas dos décadas. En Estados Unidos, alrededor del 64% de las mujeres en edad reproductiva tienen sobrepeso y el 35% son obesas, siendo este patrón similar en Europa. Existiendo, un vínculo adverso entre el ambiente intrauterino y el normal desarrollo del embrión. A partir de modelos animales y estudios en humanos se ha sugerido que la obesidad materna es capaz de establecer una marca metabólica durante el desarrollo fetal la que a largo plazo será reflejada en enfermedades en la descendencia (6).

La obesidad materna es un factor de riesgo para la ocurrencia de aborto espontáneo, tanto para la concepción natural y como concepciones logradas mediante técnicas de reproducción asistida. Así como aumenta al doble, en comparación con la población normopeso, el riesgo de muerte fetal intrauterina sin causas aparentes. Se han propuesto varios mecanismos para esta relación, incluyendo el aumento de riesgo de los trastornos hipertensivos, diabetes gestacional y preeclampsia que están asociados con la obesidad materna durante el embarazo (34).

El ambiente hormonal y bioquímico alterado durante el desarrollo embrio-fetal, influye negativamente en el desarrollo de los diferentes órganos, por lo que hijos de madres obesas están sujetos a un mayor riesgo de muerte fetal, patrones de crecimiento alterado y anomalías congénitas, presentándose los principales defectos a nivel del corazón, del tubo neural y estructuras orofaciales (14,16,17). Es importante destacar que el impacto de la obesidad materna se extiende más allá de la vida intrauterina y neonatal, pues puede generar complicaciones a largo plazo en el individuo adulto como obesidad, diabetes, hipertensión, síndrome metabólico y una variedad de enfermedades cardiovasculares entre las que se cuenta accidente vascular cerebral, infarto, insuficiencia cardíaca congestiva, angina de pecho y miocardiopatías (5,35).

5.2 Placenta

La placenta constituye la interfase entre la madre y el feto, sus funciones principales son, protección del feto en crecimiento, intercambio de nutrientes y desechos, y la producción de hormonas que controlan tanto el metabolismo materno como el crecimiento fetal. Por este motivo, una adecuada función placentaria representa un punto clave para un embarazo exitoso. En este contexto, las propiedades intrínsecas de la placenta, el tamaño, la ultraestructura, la superficie de intercambio,

el grado de vascularización, la síntesis de hormonas y la abundancia de transportadores específicos; así como las extrínsecas, nutrición materna y flujo sanguíneo uterino, son determinantes en su función (4,36,37).

5.2.1 Formación de la placenta

La formación de la placenta inicia tempranamente, desde la implantación en el endometrio materno, continuando su expansión a medida que avanza la gestación; desde este origen, se define su conformación con aporte materno, la decidua basal y derivados del blastocisto, el componente fetal.

5.2.1.1 Placentación en humanos

En humanos, el desarrollo placentario ocurre en dos periodos, a) Periodo pre-vellositario y b) Periodo vellositario. El periodo pre-vellositario inicia con la implantación del blastocisto en el endometrio materno al día sexto de gestación y termina el día 13 de vida intrauterina. Este periodo se caracteriza por la diferenciación del trofoblasto (derivado de masa celular externa) en sinciotrofoblasto y citotrofoblasto; la formación de lagunas o espacios en el estroma endometrial y la conformación de la circulación útero-placentaria primitiva ya que los capilares maternos son erosionados por la actividad sincicial y la sangre materna fluye hacia las lagunas sinciciales. En esta etapa se realiza la decidualización del estroma endometrial (7,38,39)

El periodo vellositario, se caracteriza por la formación de las estructuras que contendrán los elementos histológicos básicos para permitir el intercambio entre sangre fetal y sangre materna, las vellosidades, clasificadas en primarias, secundarias o terciarias según el desarrollo interno que tengan; así, una vellosidad terciaria tendrá citotrofoblasto, sinciotrofoblasto, mesénquima y vasos coriónicos al finalizar la tercera semana de gestación. Este tipo de vellosidad conforma la mayor parte de las vellosidades placentarias hasta el término de la gestación (7,38,40).

Concomitante con el desarrollo vellositario debe cursar la vasculogénesis y angiogénesis tanto del mesoderma extraembrionario como del embrión, de tal manera que una vez desarrollados vasos alantoideos, éstos alcanzan la placa coriónica y se fusionan con los vasos coriónicos. La circulación feto-placentaria primitiva se establece a principios de la quinta semana con la fusión de suficientes segmentos capilares entre sí, para formar un lecho capilar (38).

A medida que avanza la gestación, las vellosidades terciarias sufren cambios de tipo estructural y funcional, dando origen a varios tipos vellositarios funcionales. Las vellosidades que se unen a la cubierta citotrofoblástica se denominan vellosidades de anclaje, de la ramificación del árbol vellositario se originan lateralmente

vellosidades intermedias y vellosidades terminales o libres. Estas últimas quedan flotando en el espacio intervilloso en contacto directo con la sangre materna (plasma en etapas tempranas) (7,38,40).

Durante el desarrollo placentario es muy importante considerar el proceso de remodelación que sufren las arteriolas espirales por cuenta del trofoblasto de las columnas citotrofoblásticas que migran entre la octava y décima semana de gestación hacia el tejido intersticial del endometrio y se ubican alrededor de la arteriolas espirales, reemplazan tanto la pared muscular como las células endoteliales de la túnica íntima, de esta manera se obtiene un vaso amplio, rígido y no contráctil, que permite el transporte de grandes cantidades de sangre a bajas presiones (41). Estos vasos permanecen con un tapón de células trofoblásticas, que sirven de filtros entre la octava y décima semana de gestación, por lo cual el espacio intervilloso placentario está inicialmente bañado por filtrado de la sangre materna (plasma) con baja tensión de oxígeno (42).

Entre las semanas 10 y 12 se establece una circulación feto-placentaria parcial y las vellosidades placentarias son expuestas a la sangre materna. Entre las semanas 16 y 18, el trofoblasto extravelloso invade los segmentos miometriales de las arterias espirales, completándose así la remodelación de los vasos uterinos. La circulación feto-placentaria definitiva se establece entre las semanas 20 y 22 de gestación (43,44).

5.2.1.2. Placentación en murinos

El proceso de la formación placenta de rata inicia al igual que en humanos con la implantación; la diferenciación del trofoblasto ocurre en el estadio (E) 7.5 y la remodelación de las arterias espirales inicia en el E12.0 (45–49).

El componente fetal o trofoblástico de la placenta de rata, está constituido por dos componentes: 1) zona de unión de la placenta y 2) zona del laberinto. La primera zona a su vez, se observa compuesta por: espongiotrofoblastos, células glucogénicas, células trofoblásticas gigantes. En cuanto a la zona del laberinto, está formada por células trofoblásticas del corion y vasos sanguíneos; su proceso de formación ocurre entre los días E8.5 y E11.5 (50,51).

El componente materno de la placenta, la decidua, se forma por el cambio fenotípico de las células estromales endometriales como respuesta a la estimulación dada por la aposición del blastocisto. Las células que rodean al blastocisto implantado, conforman la zona de decidualización primaria hacia el día E7.0; las células más alejadas forman la segunda zona de decidualización. A medida que el embrión va creciendo, la zona de decidualización primaria se adosa a la secundaria y degenera. La zona de decidualización secundaria, forma la decidua capsular, parietal y la basal. La decidua basal es importante para el proceso de angiogénesis y

establecimiento de la conexión madre – feto (52). Las células deciduales cumplen con la función de alimentación histiocítica del embrión durante el desarrollo temprano y controlan la invasión trofoblástica, en estadios avanzados.

La placenta de la rata completa su desarrollo el día E12.0, queda conformada por tres (3) zonas, 1) zona del laberinto, 2) zona basal (zona de unión) y 3) decidua basal (Fig. 1). La zona del laberinto corresponde a vellosidades placentarias muy ramificadas; tres capas de trofoblasto separan los capilares fetales de la sangre materna, la primera capa, tapiza los espacios maternos y se compone de células trofoblásticas gigantes sinusoidales (citotrofoblasto), las segunda y tercera capas, corresponden a sinciotrofoblasto. Los espacios maternos del laberinto se comunican con el canal arterial materno, estructura que atraviesa la zona de unión y permite el transporte de sangre desde los vasos maternos ubicados en la decidua basal o zona mesometrial, hacia los espacios maternos (52) (Fig. 2).

El establecimiento de la circulación efectiva entre madre y feto, depende de la remodelación de los vasos maternos, lo cual permite obtener grandes cantidades de sangre oxigenada a bajas presiones. La primera invasión de las arterias espirales ocurre al E12.0 y se reemplazan las células endoteliales, por células trofoblásticas gigantes arteriales. La segunda invasión trofoblástica ocurre al día E18.5 y consiste en la invasión intersticial de la decidua, reemplazo músculo liso de las arterias por fibrina, e invasión endovascular a nivel profundo, hasta alcanzar las arterias de la segunda capa del miometrio (29).

La placenta, a partir del día E12.0, continúa creciendo a expensas de la proliferación del trofoblasto, las vellosidades se ramifican, aumenta la densidad de capilares fetales por vellosidad y disminuye el grosor de la barrera placentaria, lo que conduce a la maduración placentaria (29).

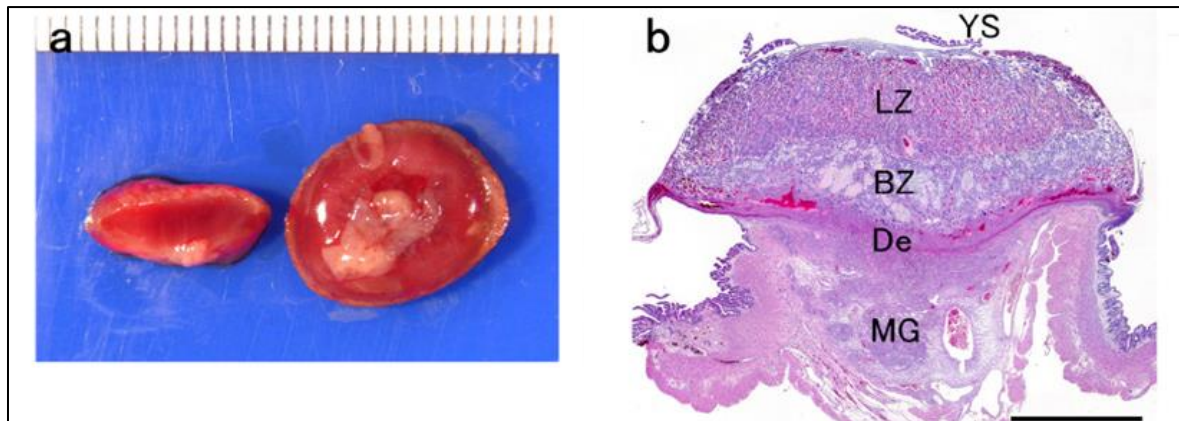


Figura 1: Estructura placentaria murina.

a. A la izquierda, se muestra una placenta en vista lateral y a la derecha de la imagen, se observa una placenta desde la cara fetal. **b.** Zonas y estructuras placentarias. MG: Zona mesometrial; De: Decidua; BZ: Zona de unión; LZ: Zona de laberinto; YS: Saco vitelino. Tomada de Furukawa y Cols. 2014.

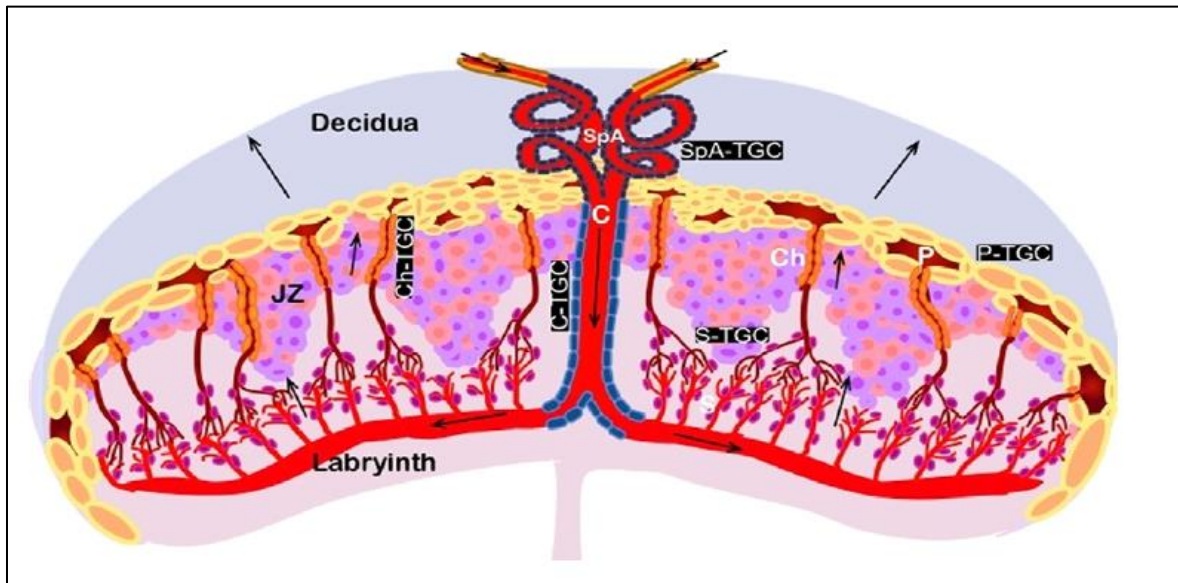


Figura 2: Circulación de la sangre materna en la placenta murina.

JZ: Zona de unión; SpA: Arterias espirales; SpA-TGC: Células trofoblásticas asociadas a arterias espirales; C: Canal arterial; C-TGC: Células trofoblásticas asociadas al canal arterial; S-TGC: Células trofoblásticas sinusoidales; Ch: Canales venosos; Ch-TGC: Células trofoblásticas asociadas a canales venosos; P: Espacios venosos parietales; P-TGC: Células trofoblásticas gigantes parietales. *Tomada de Rai, A y Cross, J 2014 (53).*

5.2.2 Comparativo entre la placenta humana y murina

El uso de biomodelos murinos es común en estudios de placentación, puesto que, por condiciones éticas, estudiar la placenta durante la gestación por métodos invasivos no es viable. Además, el uso de biomodelos permite obtener el estado de obesidad en un ambiente controlado y facilita el análisis de sus efectos sobre el órgano placentario.

El periodo de gestación de la rata es de 22 a 23 días; tienen en promedio 12 crías. Tiene un útero bicorneo conformado por dos cuernos laterales, unidos en la región distal formando un cuerpo único (54). Las implantaciones en estos biomodelos se distribuyen en los cuernos laterales. Cada implantación desarrolla su propia placenta, de forma discoidea.

La rata constituye un adecuado biomodelo para estudiar la formación y maduración de la placenta, debido a la similitud que existe entre la estructura placentaria de la zona de intercambio, entre murinos y humanos permitiendo realizar extrapolaciones (29).

La barrera placentaria en humanos y murinos es de tipo hemocorial, sólo componentes fetales separan la sangre materna de la sangre fetal. La barrera placentaria en humanos está formada por una capa continua de sinciotrofoblasto que cubre la superficie de las vellosidades, una capa de citotrofoblasto discontinua, la membrana basal y el endotelio fetal. La barrera placentaria en los murinos, se compone por el endotelio fetal, la membrana basal, dos (2) capas de sinciotrofoblasto (comunicadas entre por uniones tipo gap) y una capa de citotrofoblasto con fenestraciones (células trofoblásticas gigantes sinusoidales) (Fig. 3).

La remodelación de las arterias espirales ocurre de forma similar en humanos y ratas; la remodelación es profunda, endovascular e intersticial, con el reemplazo del endotelio y músculo liso por células trofoblásticas (Fig. 4). En ambas especies, la función placentaria, definida como la habilidad de la placenta para intercambiar nutrientes y desechos entre madre y feto, depende del flujo sanguíneo materno y fetal, de las características físicas de la barrera placentaria, área de superficie y grosor, así como de la funcionalidad de los sistemas de transporte (aminoácidos, glucosa, etc).

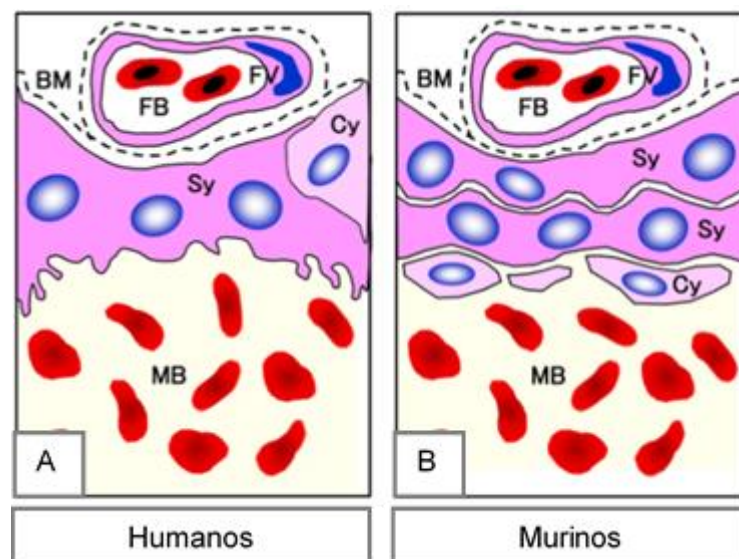


Figura 3: Componentes de la barrera placentaria

A. Barrera placentaria en humanos. B. Barrera placentaria en murinos. FV: Vaso fetal; FB: Sangre fetal; BM: membrana basal; Sy: Sinciotrofoblasto; Cy: Citotrofoblasto; MB: Sangre materna. Tomada de Furukawa y Cols. 2014

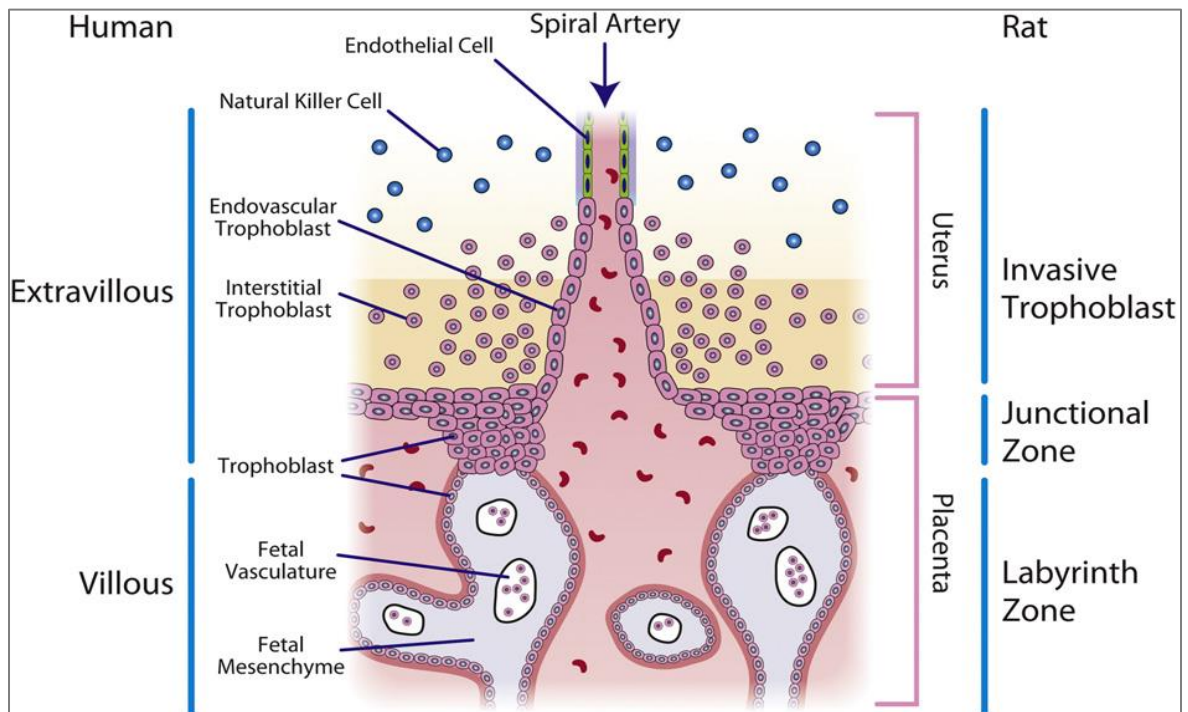


Figura 4: Invasión de las arterias espirales en humanos y murinos.
Tomada de Soares y Cols. 2012

5.3 Placenta y obesidad

La placenta es un órgano que brinda información relevante sobre el estado de la gestación; sin embargo por muchos años fue considerado un órgano olvidado y la mayoría de los estudio se enfocaban principalmente en la determinación de alteraciones en la estructura placentaria asociadas a enfermedades infecciosas, causadas por bacterias, parásitos y virus, o diabetes mellitus gestacional.

En los últimos años el estudio de la placenta ha tomado interés, debido al aumento de las complicaciones gestacionales, relacionadas con el estado nutricional materno. A continuación se resumen los hallazgos histopatológicos asociados con obesidad, reportados en varios estudios retrospectivos realizados en placentas humanas; también se presentan estudios realizados en modelos murinos con obesidad inducida por dieta.

Roberts y cols. en 2011, revisaron 40 placentas provenientes de mujeres obesas y normopeso; encontraron como principal resultado aumento de la musculatura de los vasos en las placentas de madres obesas (55); en 2012, *Bar y cols.* en un estudio retrospectivo entre los años 2010 y 2011, analizaron 28 placentas de mujeres

normopeso y 28 placentas de mujeres obesas; del grupo de las obesas, ocho (8) presentaron pre-eclampsia, cuatro (4) diabetes gestacional y una (1) restricción del crecimiento intrauterino, además, este grupo presentó mayor tasa de lesiones inflamatorias maternas que el grupo de control de peso normal. En la comparación de hallazgos histopatológicos entre las placentas de mujeres con complicaciones y sin complicaciones, no encontraron diferencias significativas (56).

Castejón y Josmar en 2013, reportaron el estudio histopatológico de la estructura vellositaria de dos placentas a término, provenientes de madres obesas e hipertensas asociadas a mortinato y encontraron abundantes vellosidades intermedias inmaduras, vellosidades fibróticas, vellosidades intermedias maduras poco desarrolladas, vellosidades terminales filiformes, depósito fibrinoide, escasa arborización, alteraciones en desarrollo de los vasos tales como: hiperplasia de la túnica media, vasodilatación, hipercapilarización, corangiosis (57).

Saben y cols. en 2014 revisaron en 24 placentas provenientes de dos grupos, uno de normopeso y uno obeso reportaron la presencia de lípidos en ambos grupos, con un incremento de un 50% de ellos en placentas provenientes de madres obesas; estos lípidos se encontraron tanto en el estroma como en el sinciotrofoblasto de las vellosidades (58).

En el año 2014 se reportó un estudio retrospectivo histopatológico de 39774 participantes colectadas entre los años 1959 y 1966 que fueron categorizadas en grupos: bajo peso, peso normal, sobrepeso y obesidad. Este estudio reportó que el grupo de gestantes con obesidad, presentó mayor riesgo de insuficiencia placentaria, lesiones vasculares y vellosas de origen materno, infiltración neutrofílica fetal, meconio en las membranas fetales e inmadurez placentaria (59).

Loardi y cols. en 2015 realizaron estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos en 20 placentas, 10 de madres normopeso y 10 provenientes de mujeres obesas, con gestación a término. En las placentas provenientes de madres obesas se encontraron predominio de vellosidades inmaduras, de gran diámetro, respuesta inflamatoria (villitis, intervillitis, decidualitis) y lesiones vasculares tipo trombosis, depósitos de fibrina, enfermedad fetal oclusiva, aumento de vasos vellositarios (60).

Kovo y cols. entre el 2007 y 2013, analizaron 124 placentas provenientes de madres normo peso y 62 de madres obesas, en las placentas del grupo obeso se observó una mayor tasa de lesiones vasculares placentarias maternas (61). *He y cols. en el 2016* estudiaron 45 placentas de mujeres nomopeso y 47 placentas de mujeres obesas, ellos reportaron que las placentas provenientes de madres obesas fueron más pesadas y presentaron trombos intervillosos, corioamnionitis y vasculitis de vasos fetales (62).

León-García y cols. en 2016 estudiaron 192 placentas de madres normopeso y 231 de madres obesas; la obesidad se asoció con crecimiento excesivo de la placenta

e hipoxia fetal evidenciada por normoblastemia, también se presentó mayor incidencia de villitis crónica y trombosis fetal (63). *Bar y cols. en 2017* estudiaron 163 placentas provenientes de mujeres normopeso y 106 de mujeres obesas; ellos concluyeron que la obesidad se asocia con mayor tasa de anomalías del suministro vascular placentario y tiene un efecto más adverso en la circulación vascular fetal que en el suministro vascular materno (64).

También se han realizado investigaciones de los efectos de la obesidad sobre el órgano placentario, empleando biomodelos murinos con obesidad inducida por dieta, sin embargo, los resultados de los diferentes investigadores, arrojan información contradictoria, relacionada con la histomorfometría de la placenta; *Mark y cols. 2011, Karakas y cols. 2011, Hayes y cols. 2012, Rosario y cols. 2015, Lager y cols. 2016, Panchenko y cols. 2016 y Song y cols. 2017*, no encontraron diferencias significativas al comparar el peso placentario del grupo control y del grupo obeso (20,21,25,26,65–67). *Akyol y cols. 2009, Reynolds y cols. 2015, Crew y cols. 2016 y Mumme y cols. 2016*, reportaron disminución del peso placentario en el grupo obeso, comparado con el grupo control (19,23,24,68); mientras que *Kim y cols. 2014 y Sasson y cols. 2015*, reportaron aumento del peso placentario en el grupo obeso (22,69).

En los estudios de *Hayes y cols. 2012 y Song y cols. 2017*, no se afectó el grosor placentario central. *Karakas y cols. 2011, Reynolds y cols. 2015 y Sasson y cols. 2015*, evaluaron el grosor de la zona del laberinto, no encontrando diferencias entre los grupos analizados; sin embargo, *Kim y cols. 2014 y Song y cols. 2017*, reportaron disminución de esta variable, en el grupo obeso (21–23,65,67,69). *Mark y cols. 2011*, no encontraron diferencias significativas en el área de la zona del laberinto del grupo obeso comparado con el grupo control, mientras que *Crew y cols. 2016*, reportaron disminución del área de la zona del laberinto en el grupo obeso (20,24).

Hayes y Cols. en el 2012, reportaron, que la obesidad materna se relacionó con el aumento del área placentaria, del área de la zona del laberinto y de la densidad de vasos fetales a la mitad de la gestación, sin embargo, al final de la gestación, la densidad de vasos fetales no varió en comparación con el grupo normo-peso (21).

Aunque los estudios de los efectos de la obesidad sobre la estructura placentaria, tanto en humanos como en modelos murinos, son poco concluyentes, estos antecedentes muestran un daño histomorfológico placentario asociado con la obesidad y esta lesión estructural de la placenta puede ser relacionada con alteraciones en la funcionalidad del órgano.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La obesidad promueve cambios histo-morfológicos en la placenta de 16.5 días de gestación proveniente de ratas con obesidad pre-gestacional?

7. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar morfológicamente la placenta de 16.5 días de gestación proveniente de ratas con obesidad pre-gestacional adquirida por dieta de cafetería.

Objetivos específicos

- Caracterizar macroscópicamente la placenta de ratas obesas y controles
- Caracterizar histo-morfológicamente las zonas de la placenta de ratas obesas y controles
- Cuantificar la densidad de vasos fetales en el laberinto placentario de ratas obesas y controles

8. DISEÑO METODOLÓGICO

8.1 Tipo de estudio

Estudio experimental

8.2 Unidad de análisis

Las muestras analizadas fueron 27 placentas, seleccionadas a partir del total, correspondiente a 68 placentas de rata Wistar de 16.5 días de gestación, obtenidas durante el desarrollo del proyecto “Efectos de la obesidad materna sobre el desarrollo cardíaco fetal”. En el cual se establecieron dos grupos experimentales alimentados con dietas diferenciadas; el grupo control fue alimentado con dieta estándar (Lab Diet 5001) y el grupo obeso fue alimentado con dieta estándar más dieta de cafetería tipo snack.

8.3 Consideraciones éticas

Este proyecto se originó y se enmarca dentro del proyecto “Consecuencias de la obesidad materna sobre el desarrollo fetal” (acta de aval N° 01-2012). Para el desarrollo del estudio, fueron utilizados biomodelos suministrados por el “Laboratorio Intermedio de Investigación Preclínica y Bioterio – LABBIO” de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, el cual cumple con los requerimientos establecidos en las normas nacionales e internacionales; “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences National Research Council, Ley 84 de 1989 y el reglamento del bioterio, que son recogidas en el manual del Bioterio de la Facultad de Salud (Resolución No. 171 de Noviembre 10 de 2004 del Consejo de la Facultad de Salud)(70)

Para todos los procedimientos, los biomodelos fueron llevados a sedación profunda. Este procedimiento se realizó administrando al biomodelo anestesia inhalatoria con Isoflurano al 100% (Isoflurano USP® - Baxter), mediante vaporizador, a concentración alveolar media de 1.5% como dosis de inducción y 1.0% como dosis de mantenimiento. Posteriormente, los biomodelos fueron sacrificados mediante sobredosis de isoflurano, a concentración alveolar media mayor a 5%, el animal se mantuvo bajo observación cinco minutos, tiempo durante el cual se verificó el cese de la respiración, la ausencia de latidos cardíacos, la presentación de córnea opaca, relajación de esfínteres y ausencia de reflejos plantares (71).

El proyecto además cuenta con el aval específico, otorgado por el *Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales de Experimentación*: acta de aval N° 001-017 (Fig.5).

Proyecto:	"CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLACENTA DE 16.5 DÍAS DE GESTACIÓN PROVENIENTE DE RATAS CON OBESIDAD PREGESTACIONAL"		
Línea biomédica:			
Sometido por:	Carolina Pustovrh, Liliana Salazar, Yhoiss Muñoz		
Código Interno:	001 - 017	Fecha en que fue sometido:	10 05 2017
Fecha Certificación CEAS:	31 05 2017		

Figura 5: Acta de aval del Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales de Experimentación.

8.4 Protocolo de trabajo

A continuación se realiza un breve resumen de la generación del biomodelo de obesidad y la obtención de las muestras. Posteriormente, se presenta la metodología detallada para la resolución de cada objetivo específico y los resultados del trabajo de investigación como tal.

8.4.1 Biomodelo de obesidad

En la generación del biomodelo de obesidad, se usaron ocho ratas Wistar hembras de dos meses de edad, divididas en dos grupos experimentales: 1) grupo control (n=4), el cual fue alimentado con dieta estándar (DE), dieta comercial LAB DIET 5001 (Lab Chow Rodentia Purina). Composición nutricional: proteína cruda mínimo 23,0%; grasa cruda mínimo 4,5%; fibra cruda máximo 6,0%; cenizas máximo 8,0%, minerales agregados máximo 3,0%. 2) Grupo obeso (n=4), el cual fue alimentado con dieta estándar (DE) comercial Lab Diet 5001, complementada con una dieta hipercalórica altamente palatable denominada dieta de cafetería con incentivo (DC), compuesta por 17 alimentos diferentes debidamente codificados y contenido nutricional establecido (Tabla 1).

Tabla 1. Alimentos suministrados a los biomodelos maternos durante la dieta de cafetería

Código Asignado	Alimento	K calorías
1	Cereal horneado de maíz con queso	50
2	Queso doble crema	300
3	Tocineta	70
4	Panecillos crocantes de harina de trigo	120
5	Papas fritas	547,2
6	Panecillos de mantequilla	380
7	Galletas dulces rellenas	200
8	Chocolatina	200
9	Pastel de vainilla bañado en chocolate	300
10	Rosquillas	65
11	Pellet - Estándar LAB DIET 5001	100
12	Cereales dulces saborizados	391,1
13	Maíz inflado sabor a queso	220
14	Galletas saladas	180
15	Brownie	100
16	Galletas Trigo Maíz	419
17	Maíz inflado bañado en caramelo	240
18	Salchicha	130

Tomado de *Tejada ME*. Efectos de la obesidad materna sobre el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía de la rata Wistar. Universidad del Valle; 2016.

Durante un periodo de seis semanas el alimento y el agua fue administrado en exceso a ambos grupos. La ingesta de alimento fue monitoreada diariamente. El peso, talla y circunferencia abdominal se evaluaron semanalmente.

Al finalizar la sexta semana de alimentación los animales del grupo obeso superaban el 20% de incremento comparado con el peso inicial; los parámetros bioquímicos correspondientes a glicemia, colesterol total y triglicéridos permanecieron dentro los valores normales.

En este momento, se dio inicio al seguimiento del ciclo estral y apareamiento de biomodelos.

La evaluación diaria del ciclo estral se realizó mediante citologías vaginales, las cuales se visualizaron en fresco con el fin de determinar la fase de proestro (etapa previa al celo). Las hembras en proestro fueron trasladadas al área de apareamiento y depositadas en la jaula con un macho adulto. Al día siguiente, en horas de la mañana (7-9 AM), se confirmó la preñez por medio de la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal. A este día se le denominó: 0,5 de preñez, y se contabilizaron 16 días más para obtener biomodelos preñados con 16.5 días de gestación (dg).

8.4.2 Obtención de las muestras

Finalizado el tiempo de gestación (16,5 dg), se procedió a la interrupción de la preñez de los biomodelos para la obtención de las placentas y los embriones; para ello se siguió el protocolo de disección de biomodelos maternos, realizándose anestesia inhalatoria con isoflurano, hasta sedación profunda. Posteriormente, se realizó la evaluación de la pérdida de la sensibilidad del biomodelo monitoreando la ausencia de reflejos plantares de la extremidad inferior. Inmediatamente se procedió a la disección del útero y las implantaciones bajo estereomicroscopio (Meiji RZT techno) con cámara fotográfica acoplada al programa de análisis de imágenes Infinity. La ubicación de las implantaciones fue registrada numerando en cada cuerno desde las placentas más próximas al cuello uterino hasta las adyacentes al ovario (Anexo 1).

Se obtuvo un total de 68 placentas, 41 placentas del grupo control (GC) proveniente de cuatro hembras gestantes y 27 placentas del grupo obeso (GO) provenientes de tres hembras gestantes, una hembra de este grupo presentó detención del ciclo estral y no consiguió la preñez; según criterios de inclusión y exclusión fueron seleccionadas 16 placentas provenientes del grupo control y 11 placentas del grupo obeso, y se procedió a resolver los tres objetivos específicos propuestos.

A continuación se presentan los métodos usados y los resultados obtenidos por cada objetivo específico, con el fin de darle respuesta al objetivo general del trabajo de investigación, correspondiente a “caracterizar morfológicamente la placenta de 16.5 días de gestación proveniente de ratas con obesidad pre-gestacional adquirida por dieta de cafetería”. La información se presenta en el siguiente orden: 1) Evaluación de las dimensiones macroscópicas de la placenta; 2) Descripción histológica de la placenta y evaluación de las dimensiones microscópicas placentarias y 3) Recuento del número de capilares coriónicos presentes en el laberinto placentario.

9. MÉTODOS Y RESULTADOS

Como se indicó previamente, la información relacionada con los métodos utilizados y los resultados obtenidos se presentan por cada objetivo específico, en el siguiente orden: I) Evaluación de las dimensiones macroscópicas de la placenta; II) Descripción histológica de la placenta y evaluación de las dimensiones microscópicas placentarias y III) Recuento del número de capilares coriónicos presentes en el laberinto placentario.

I. EVALUACIÓN DE LAS DIMENSIONES MACROSCÓPICAS DE LA PLACENTA

1. Unidad de análisis

Las variables fueron evaluadas en 27 placentas que correspondieron 16 del grupo control y 11 del grupo obeso; y fueron seleccionadas de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión que se describen a continuación.

2. Criterio de inclusión

Se analizaron las placentas ubicadas en las posiciones centrales de los cuernos uterinos como se representa en el esquema (Fig.6).

3. Criterio de exclusión

Se excluyeron las placentas con daños macroscópicos a causa de la disección.

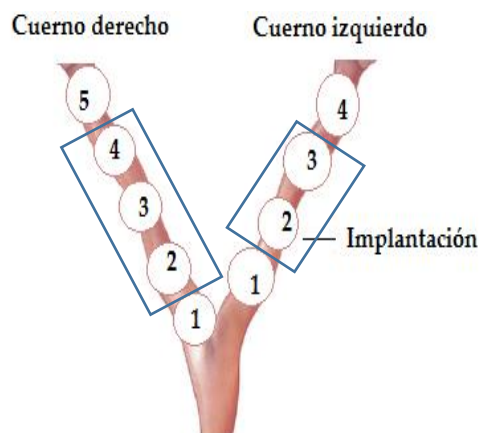


Figura 6: Ubicación de placentas en el útero.

Modificado a partir de, Treuting P, Dintzis S. Comparative anatomy and histology. Oxford: Academic; 2012.

4. Protocolo de trabajo

Las placentas fueron recibidas en alcohol al 70%, con una fijación previa en paraformadehído al 4 % por 12 horas y acompañadas de un esquema que contenía la ubicación de cada placenta en los cuernos uterinos y el peso placentario. Posteriormente se inspeccionó cada una de las placentas y se procedió a realizar las medidas macroscópicas morfométricas por triplicado (Anexo 2).

4.1 Variables

Las variables analizadas fueron: peso, diámetro mayor, diámetro menor y grosor placentario; además se calculó el área y el volumen placentario (Tabla 2).

Tabla 2. Variables macroscópicas analizadas

Variable	Unidades / denominación	Tipo	Escala
Peso placenta	Gramos (g)	Cuantitativa continua	Razón
Diámetro mayor	Milímetros (mm)	Cuantitativa continua	Razón
Diámetro menor	Milímetros (mm)	Cuantitativa continua	Razón
Grosor placentario	Milímetros (mm)	Cuantitativa continua	Razón
Área de superficie placentaria de la cara fetal	Milímetros cuadrados (mm ²)	Cuantitativa continua	Razón
Volumen placentario	Milímetros cúbicos (mm ³)	Cuantitativa continua	Razón

4.1.1 Peso

Los pesos fueron registrados previamente por el proyecto que facilitó las muestras. Las placentas se pesaron en balanza digital calibrada, con precisión 0,01 g.

4.1.2 Diámetro y área placentaria de la cara fetal

Para las medidas de superficie placentaria de la cara fetal se determinó el área de una elipse, con la siguiente fórmula: Diámetro menor x diámetro mayor x $\pi/4$; las dimensiones del diámetro mayor y menor se obtuvieron con un calibrador digital con precisión 0.01mm. Para lo cual, las puntas del calibrador se colocaron en el borde de la placenta y se midió los dos ejes que se cortan perpendicularmente en el centro de la misma (Fig. 7), (72,73).

4.1.3 Grosor del órgano placentario

El grosor placentario fue medido tomando como referencia la línea media o sitio de inserción del cordón, usando un calibrador digital con precisión de 0.01mm (Fig. 7).

4.1.4 Volumen placentario

Esta variable se calculó usando el grosor central en la siguiente formula: $\pi r^2 \times \text{grosor}$ (Fig. 7).

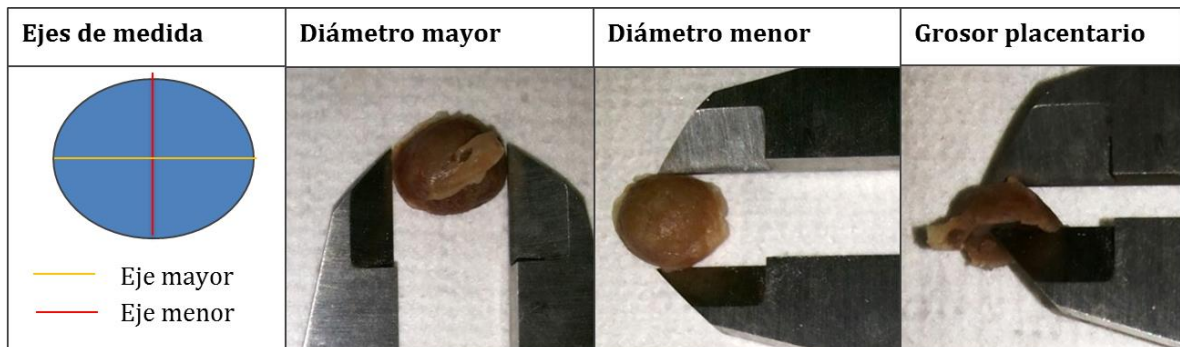


Figura 7: Mediciones macroscópicas de la placenta de 16.5 dg usando calibrador digital.

4.2 Prueba intra e interobservador

Para estandarizar el proceso de medición de variables macroscópicas, se hizo una prueba intraobservador y una interobservador.

Para la prueba intraobservador, el investigador realizó mediciones por triplicado de las variables a analizar de todas las placentas escogidas para el análisis macroscópico.

Para la prueba interobservador, el par evaluador midió por triplicado las mismas variables en ocho placentas por cada grupo experimental y se hizo el respectivo análisis usando la herramienta de índice de correlación intraclass del paquete estadístico SPSS 22.

4.2.1 Prueba intraobservador

Las variables macroscópica de diámetro mayor, diámetro menor y grosor central mostraron un grado de acuerdo casi perfecto, entre las tres repeticiones realizadas por variable, según los rangos establecidos por *Landis y Koch* (tabla 3),(74).

Tabla 3. Prueba intraobservador de las variables macroscópicas

Variable	Índice de correlación intraclass	Grado de acuerdo
Diámetro mayor	0.979	Casi perfecto
Diámetro mayor	0.985	Casi perfecto
Grosor placentario	0.976	Casi perfecto

<i>Rangos de Landis y Koch (74)</i>	Valor	Grado de acuerdo
	0	Pobre
	0.01-0.20	Leve
	0.21-0.40	Regular
	0.41-0.60	Moderado
	0.61-0.80	Substancial
	0.81-1.00	Casi perfecto

4.2.2 Prueba interobservador

Las variables macroscópica de diámetro mayor, diámetro menor y grosor central mostraron un grado de acuerdo substancial, entre las mediciones del investigador y el par evaluador, según los rangos establecidos por *Landis y Koch* (tabla 4),(74).

Tabla 4. Prueba interobservador de las variables macroscópicas

Variable	Índice de correlación intraclase	Grado de acuerdo
Diámetro mayor	0.733	Substancial
Diámetro menor	0.632	Substancial
Grosor placentario	0.767	Substancial

4.3 Análisis estadístico

Se usó el paquete estadístico SPSS22 para evaluar el comportamiento de las variables en cuanto a su distribución con la prueba Shapiro Wilks, verificándose el comportamiento normal de todas las variables analizadas. Las variables fueron comparadas entre los grupos, usando el test paramétrico para comparación de medias, t-Student.

Los datos se presentan para cada grupo (grupo control, GC y grupo obeso, GO) como la media \pm el error estándar (EE); las variables analizadas que mostraron diferencias significativas se acompañan del valor P y las “no significativas”, se acompaña de “ns”.

5. Resultados

La placenta de rata con 16.5 dg tiene forma discoidea, el área de superficie de la cara fetal tiene forma elipsoidal y se conecta con el feto en desarrollo a través del cordón umbilical. La cara materna es irregular y conserva restos de miometrio materno. El análisis de las variables macroscópicas placentarias correspondientes a peso (**GC**: 0.3017 ± 0.0094 g; **GO**: 0.2990 ± 0.0130 g; ns), diámetro mayor (**GC**: 10.92 ± 0.13 mm; **GO**: 10.74 ± 0.22 mm; ns), diámetro menor (**GC**: 9.10 ± 0.16 mm; **GO**: 9.20 ± 0.18 mm; ns), grosor central (**GC**: 3.40 ± 0.07 mm; **GO**: 3.32 ± 0.05 mm; ns), área de superficie placentaria de la cara fetal (**GC**: 78.20 ± 1.99 mm²; **GO**: 77.56 ± 2.00 mm²; ns) y volumen placentario (**GC**: 267.1 ± 8.8 mm³; **GO**: 258.1 ± 8.4 mm³;

ns). Ninguna de las variables macroscópicas analizadas presentó diferencias significativas entre los grupo control y grupo obeso (Fig.8-13).

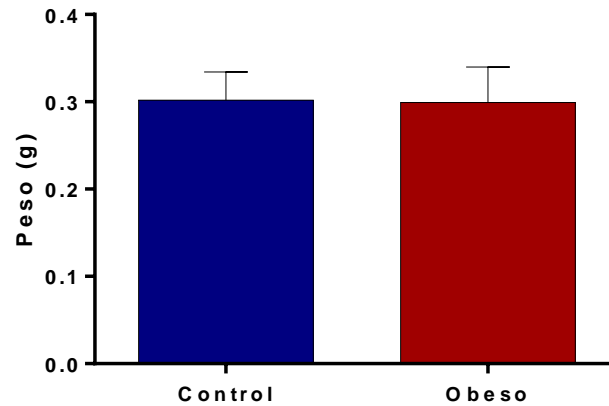


Figura 8: Comparación del peso placentario entre el grupo control y obeso. El peso se indica en gramos (g). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

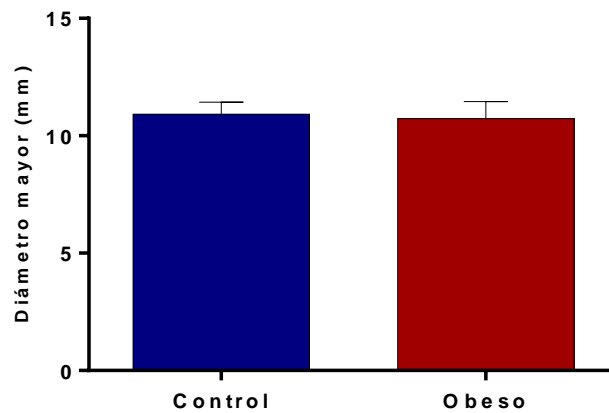


Figura 9: Comparación del diámetro mayor placentario entre el grupo control y obeso. El diámetro placentario mayor se indica en milímetros (mm). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

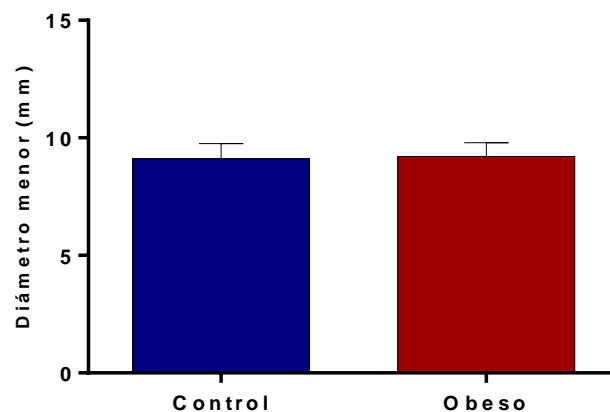


Figura 10: Comparación del diámetro menor placentario entre el grupo control y obeso. El diámetro placentario menor se indica en milímetros (mm). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

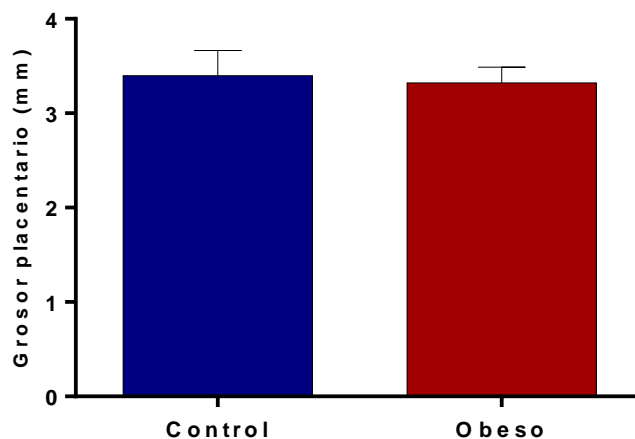


Figura 11: Comparación del grosor placentario central entre el grupo control y obeso. El grosor placentario se indica en milímetros (mm). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

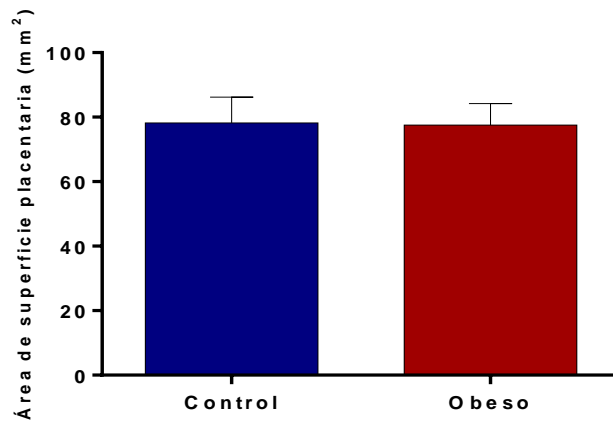


Figura 12: Comparación del área de superficie placentaria de la cara fetal entre el grupo control y obeso.

El área placentaria se indica en milímetros cuadrados (mm^2). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

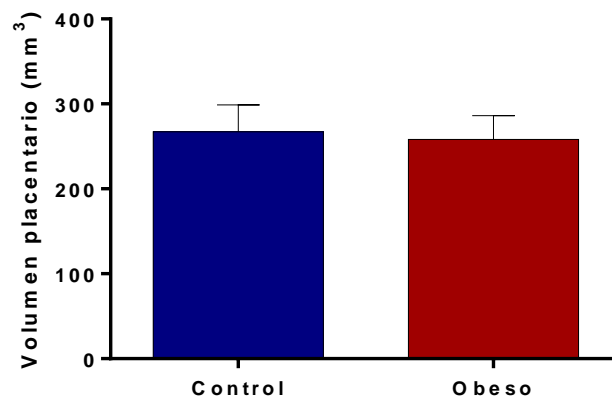


Figura 13: Comparación del volumen placentario entre el grupo control y obeso.

El volumen placentario se indica en milímetros cúbicos (mm^3). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

II. CARACTERIZACIÓN HISTO-MORFOLÓGICA DE LA PLACENTA DE RATA

1. Unidad de análisis

Muestras histológicas procesadas para técnica histoquímica de hematoxilina-eosina

2. Criterio de inclusión

Se escogieron para el análisis histomorfológico las muestras que no presentaron daños en su estructura debido al procesamiento.

3. Criterio de exclusión

Se excluyeron del análisis histomorfológico las muestras que a la revisión microscópica presentaron una inadecuada tinción.

4. Protocolo de trabajo

En el desarrollo del objetivo de esta unidad, se realizó el procesamiento de las placentas para técnica histoquímica de hematoxilina-eosina, se observaron las muestras con microscopio de luz para realizar la descripción histológica, posteriormente se realizó la captura de imágenes para la reconstrucción de la muestra histológica en una sola imagen y así facilitar la medición de las variables microscópicas propuestas.

4.1 Técnica histoquímica

Las placentas se dividieron en dos partes iguales, siguiendo la línea media (eje mayor) y atravesando el punto de inserción del cordón umbilical, para tal fin se utilizó una cuchilla metálica. Cada parte se colocó en una canastilla plástica, se rotuló con un código establecido previamente.

Las muestras fueron sometidas a procesamiento histoquímico de rutina, con una fase de deshidratación con concentraciones ascendentes de alcohol (70, 80, 95 y 100), la diafanización se realizó con xilol, y la infiltración se hizo con paraplast con punto de fusión de 58°C (45). El tiempo fue estandarizado para cada paso. El proceso se llevó a cabo de manera automatizada en el procesador de tejidos (Leica TP 1020). La inclusión se realizó en estación de inclusión (Histocentre 3), cada placenta se ubicó en un molde metálico y se recubrió con parafina líquida hasta obtener finalmente un bloque. Mediante micrótopo de rotación (Leica 2245) se obtuvieron cortes seriados de cuatro micras, se recogieron tres cortes por portaobjetos y se secaron por 24 horas a 37 °C; posteriormente se realizó la tinción de hematoxilina-eosina. El portaobjeto fue rotulado adicionando el tipo de tinción al código asignado previamente (Anexo 3).

4.2 Observación histológica de las muestras

La observación de las muestra se hizo bajo microscopio de luz con cámara digital incorporada (Leica DM750). Las muestras se visualizaron con el objetivo de 4x para reconocer cada una de las zonas placentarias, luego con el objetivo de 10x, se observaron las estructuras histológicas que conforman cada zona y el objetivo de 40x, se usó para observar los detalles de las células y su organización dentro de cada estructura histológica.

4.3 Captura y reconstrucción de imágenes

Las muestras placentarias fueron fotografiadas con magnificaciones de 4x, 10x y 40x usando el software Leica Application Suite (LASV4.7), en el cual se establecieron parámetros de captura necesarios para la obtención de una imagen de calidad.

Debido a que la captura de la muestra completa en una sola imagen con objetivo de 4x, no fue posible, se usó la herramienta de reconstrucción “*Image Builder (LIB)*” de la aplicación LASV4.7 (Anexo 4).

4.4 Variables

Una vez capturadas todas las imágenes se procedió a la determinación de las variables de área placentaria, área de zona del laberinto, grosor placentario central y grosor central de la zona del laberinto (Tabla 5). Las mediciones se realizaron sobre las reconstrucciones de las muestras a 4x, con el programa *Image-Pro Plus* 7.0, previa calibración (Anexo 5).

Tabla 5. Variables microscópicas analizadas

Variable	Unidades / denominación	Tipo	Escala
Área placentaria total	Micrómetros cuadrados (μm^2)	Cuantitativo continua	Razón
Área de zona de laberinto	Micrómetros cuadrados (μm^2)	Cuantitativo continua	Razón
Grosor placentario	Micrómetros (μm)	Cuantitativo continua	Razón
Grosor de zona de laberinto	Micrómetros (μm)	Cuantitativo continua	Razón

4.4.1 Grosor placentario central y de la zona del laberinto

Usando la herramienta de medición de longitudes y distancias de *Image-Pro Plus* 7.0, se trazó una línea central perpendicular al punto de inserción del cordón umbilical, la cual atravesó toda la muestra placentaria, luego se trazaron dos líneas paralelas a ella, una a cada lado, con una distancia interlineal de aproximadamente 800 micras, esto se hizo para determinar el grosor placentario central. Del mismo modo, se trazaron las mismas tres líneas, pero con la diferencia de que sólo abarcaban la zona del laberinto y así se determinó el grosor de esta zona. Las mediciones se realizaron por triplicado (Fig.14A y 14B.).

4.4.2 Área placentaria total y área de la zona del laberinto

Usando la herramienta de selección de área del programa *Image-Pro Plus 7.0*, se remarcó los bordes externos de la muestra placentaria y se determinó el área total placentaria, se repitió tres veces la misma medida por muestra. Del mismo modo se remarcó los límites externos de la zona de laberinto y se determinó el área por triplicado (Fig. 14C y 14D).

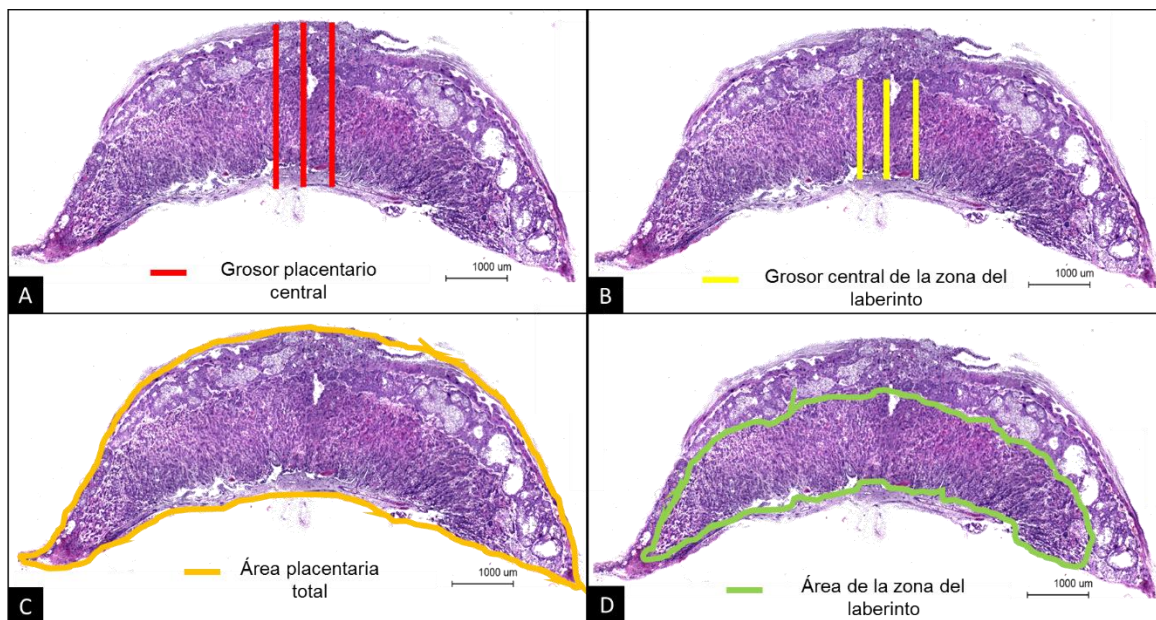


Figura 14: Representación de las medidas microscópicas placentarias

En las imágenes se muestra la forma como se realizaron las mediciones de las variables microscópicas. **A.** Grosor placentario central. **B.** Grosor central de la zona del laberinto. **C.** Área placentaria total. **D.** Área de la zona del laberinto.

4.5 Prueba intra e interobservador

Para estandarizar el proceso de medición de variables microscópicas, se hizo una prueba intraobservador y una interobservador. Para la prueba intraobservador el investigador realizó mediciones por triplicado de las variables, a todas las muestras seleccionadas para el análisis microscópico. Para la prueba interobservador el par evaluador midió por triplicado las mismas variables en tres muestras placentarias por cada grupo. Posteriormente, se realizó el análisis usando la herramienta de índice de correlación intraclass del paquete estadístico SPSS 22.

4.5.1 Prueba intraobservador

Las variables microscópicas de área placentaria, área de zona del laberinto, grosor placentario central y grosor central de la zona del laberinto mostraron un grado de

acuerdo casi perfecto, entre las tres repeticiones realizadas por variable, según los rangos establecidos por *Landis y Koch* (tabla 6),(74).

Tabla 6. Prueba intraobservador de las variables placentarias microscópicas

Variables	Índice de Correlación Intraclase	Grado de acuerdo
Grosor de placenta completa medida derecha (GCOM1)	0.997	Casi perfecto
Grosor de placenta completa medida central (GCOM2)	0.999	Casi perfecto
Grosor de placenta completa medida izquierda (GCOM3)	0.998	Casi perfecto
Grosor de zona de laberinto medida derecha (GZL1)	0.980	Casi perfecto
Grosor de zona de laberinto medida central (GZL2)	0.995	Casi perfecto
Grosor de zona de laberinto medida izquierda (GZL3)	0.993	Casi perfecto
Área de placenta completa (ACOM)	0.999	Casi perfecto
Área de placenta zona de laberinto (AZL)	0.997	Casi perfecto

4.5.2 Prueba interobservador

Las variables microscópica de área placentaria, área de zona del laberinto, grosor placentario central y grosor central de la zona del laberinto mostraron un grado de acuerdo casi perfecto, entre las mediciones del investigador y el par evaluador, según los rangos establecidos por *Landis y Koch* (tabla 7),(74).

Tabla 7. Prueba interobservador de las variables placentarias microscópicas

Variables	Índice de Correlación Intraclase	Grado de acuerdo
Grosor de placenta completa medida derecha (GCOM1)	1.000	Casi perfecto
Grosor de placenta completa medida central (GCOM2)	1.000	Casi perfecto
Grosor de placenta completa medida izquierda (GCOM3)	1.000	Casi perfecto
Grosor de zona de laberinto medida derecha (GZL1)	1.000	Casi perfecto
Grosor de zona de laberinto medida central (GZL2)	1.000	Casi perfecto
Grosor de zona de laberinto medida izquierda (GZL3)	0.998	Casi perfecto
Área de placenta completa (ACOM)	0.999	Casi perfecto
Área de zona de laberinto (AZL)	0.999	Casi perfecto

4.6 Análisis estadístico

Se usó el paquete estadístico SPSS22 para evaluar el comportamiento de las variables en cuanto a su distribución con la prueba Shapiro Wilks, verificándose el comportamiento normal de todas las variables analizadas. Las variables fueron comparadas entre los grupos, usando el test paramétrico para comparación de medias, t-Student. Los datos se presentan para cada grupo GC y GO como la media \pm el error estándar; las variables analizadas que muestren diferencias significativas se acompañan del valor P y las que sean “no significativas”, se acompaña de “ns”.

5. Resultados

5.1 Descripción histológica de la placenta de 16.5 dg

Las placentas de 16.5 dg están constituidas por tres zonas, la zona del laberinto, la zona de unión y la decidua. La zona de laberinto se encuentra hacia la cara fetal y la zona de unión limita con la decidua ubicada hacia la cara materna (Fig. 15).

La placa coriónica constituye la interfase entre el feto y la placenta, en ella se insertan y ramifican los vasos del cordón umbilical; también desde esta estructura se originan vellosidades terciarias que se extienden en dirección a la decidua, las cuales se ramifican y se interconectan quedando inmersas en lagunas llenas de sangre materna. La placa coriónica está constituida por tejido conectivo laxo, en el cual están inmersos vasos sanguíneos y externamente está recubierta por un epitelio cúbico simple, que corresponde al epitelio del amnios (Fig. 16).

En la zona de laberinto se encuentran vellosidades terciarias y lagunas maternas, las vellosidades terciarias tienen un núcleo central de tejido conectivo laxo, en el que se encuentran inmersos los vasos fetales, estos se observan recubiertos por un epitelio plano simple, llamado endotelio y transportan eritrocitos nucleados de origen fetal.

Periféricamente, las vellosidades muestran un recubrimiento celular conformado por dos tipos de características histológicas diferentes: Internamente, se detalla un cúmulo de células con núcleos pequeños, cromatina densa, sin límites citoplasmáticos visibles, este es el sinciotrofoblasto, y otro grupo celular de ubicación externa, las células citotrofoblásticas, cuyos núcleos se observan ovalados con la presencia de uno dos nucléolos. Las lagunas maternas se observan como espacios irregulares, en contacto directo con el epitelio trofoblástico y con presencia de eritrocitos anucleados. Los componentes del epitelio trofoblástico y del endotelio, constituyen la barrera placentaria, que en los murinos es de tipo hemotricorial, en la que hay tres capas de trofoblasto, dos capas de sinciotrofoblasto y una capa de citotrofoblasto separando la sangre materna de los vasos fetales. Gran parte del intercambio materno-fetal ocurre en las zonas de intercambio íntimo del laberinto, caracterizadas por vellosidades con vasos fetales muy próximos a las lagunas maternas (Fig. 17).

La zona unión, se ubica entre la decidua materna y la zona de laberinto. Esta zona se encarga de canalizar la sangre materna desde la decidua hacia la zona de laberinto. En esta zona se detallan tres tipos celulares: espongiotrofoblastos, células glucogénicas y células gigantes trofoblásticas (Fig. 18).

Los espongiotrofoblastos son células poliédricas con citoplasma ligeramente vacuolado, acidófilo, núcleo ovalado con presencia de dos a tres nucléolos y se organizan en forma de columnas irregulares. Esta organización permite que la sangre materna circule desde las arterias espirales hacia las lagunas maternas (Fig. 18 y 19).

Las células glucogénicas no presentan tinción citoplasmática, son de tamaños variables, tienen núcleos pequeños centrales, cromatina densa y se organizan en agrupaciones celulares, llamadas islas que están rodeadas por los espongiotrofoblastos (Fig. 20). Las células trofoblásticas gigantes, tienen núcleos grandes ovalados, nucléolos claramente visibles, abundante citoplasma eosinófilo y se encuentran delimitando la zona de unión de la decidua (Fig. 21).

La zona de decidua, esta contigua a las células trofoblásticas gigantes, en ella se observan agrupaciones de células pequeñas, con morfología irregular, tinción nuclear suave, núcleo ovalado con presencia de un nucléolo, toman el nombre de células deciduales. En esta zona también se observa células con núcleo central ovalado y citoplasma ahusado, denominados miocito lisos, estos se encuentran organizados en haces y descansan sobre las células deciduales (Fig. 22).

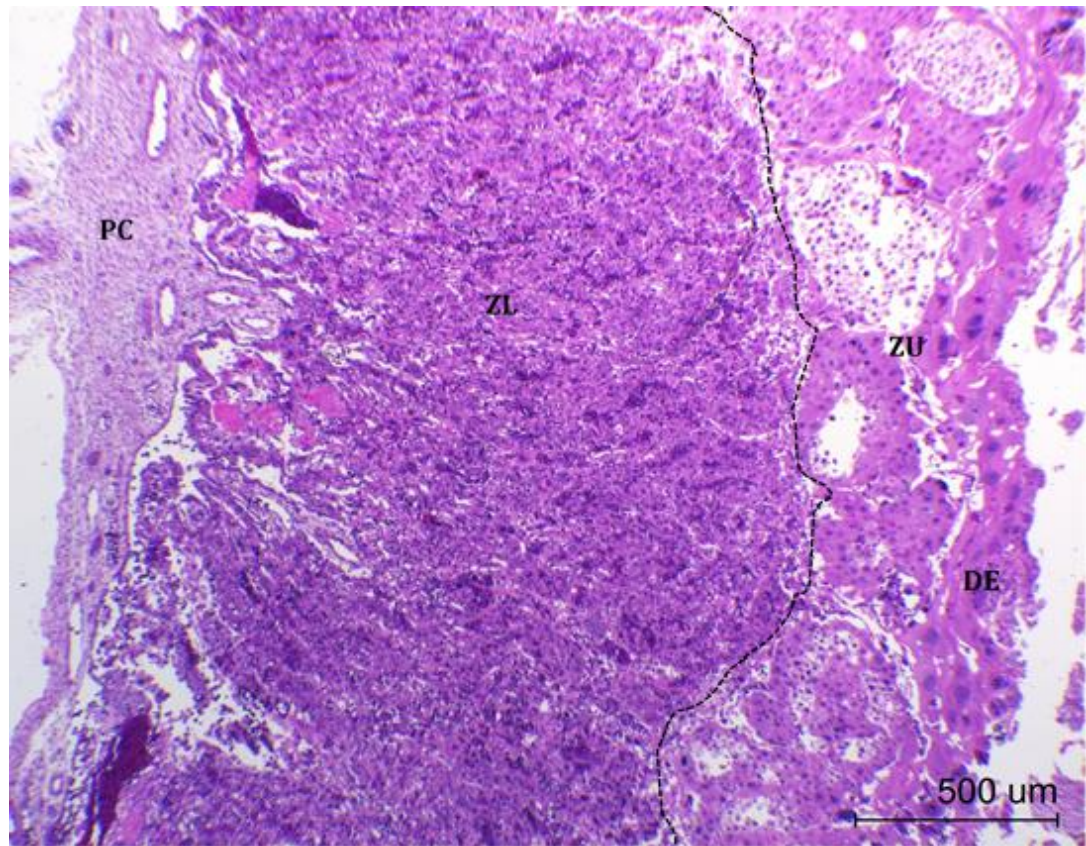


Figura 15: Placenta de rata 16.5 dg.

PC: placa coriónica; ZL: zona del laberinto; ZU: zona de unión; DE: decidua. La zona de laberinto se encuentra hacia la cara fetal y la zona de unión limita con la decidua ubicada hacia la cara materna. Corte longitudinal sobre el eje mayor de la placenta de 16.5 dg. H&E. 4X.

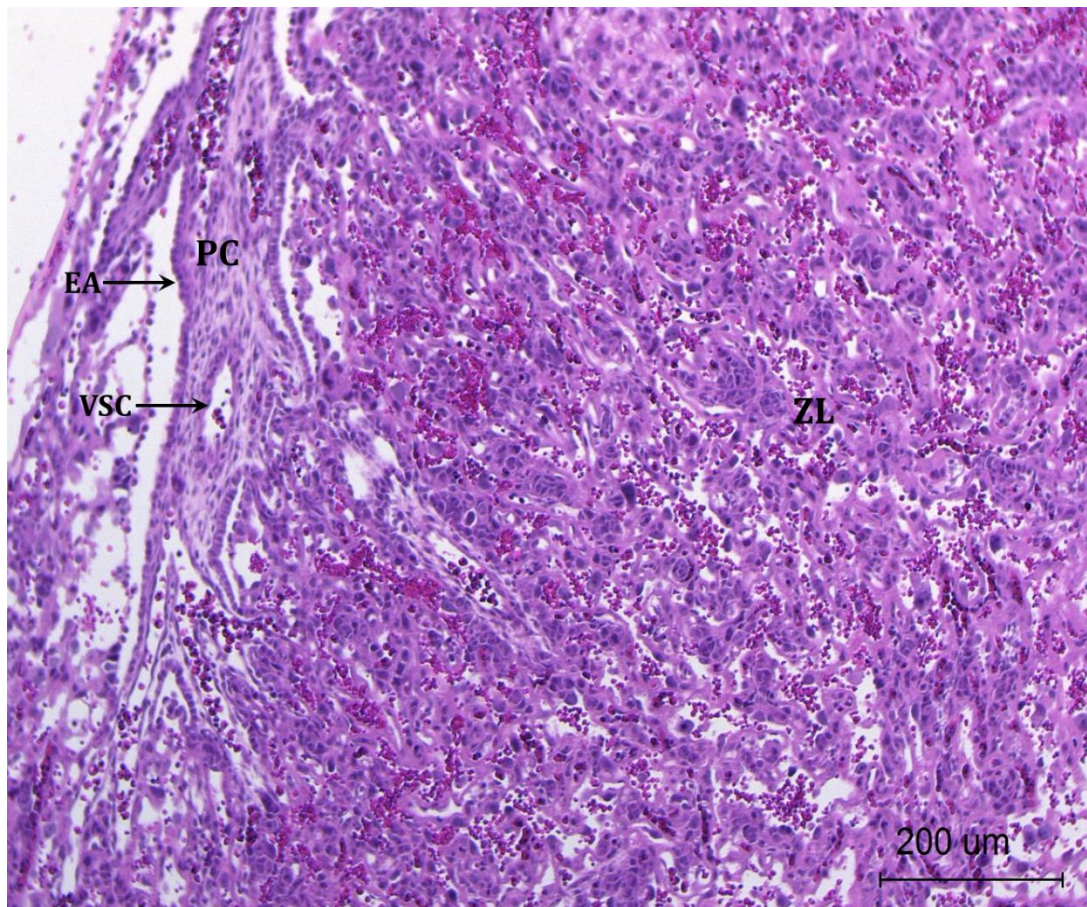


Figura 16: Constitución histológica de la placa coriónica y organización de la zona del laberinto.

PC: placa coriónica; ZL: zona del laberinto; EA: epitelio amniótico; VSC: vaso sanguíneo de la placa coriónica. Corte longitudinal sobre el eje mayor de la placenta de 16.5 dg. H&E. 10X.

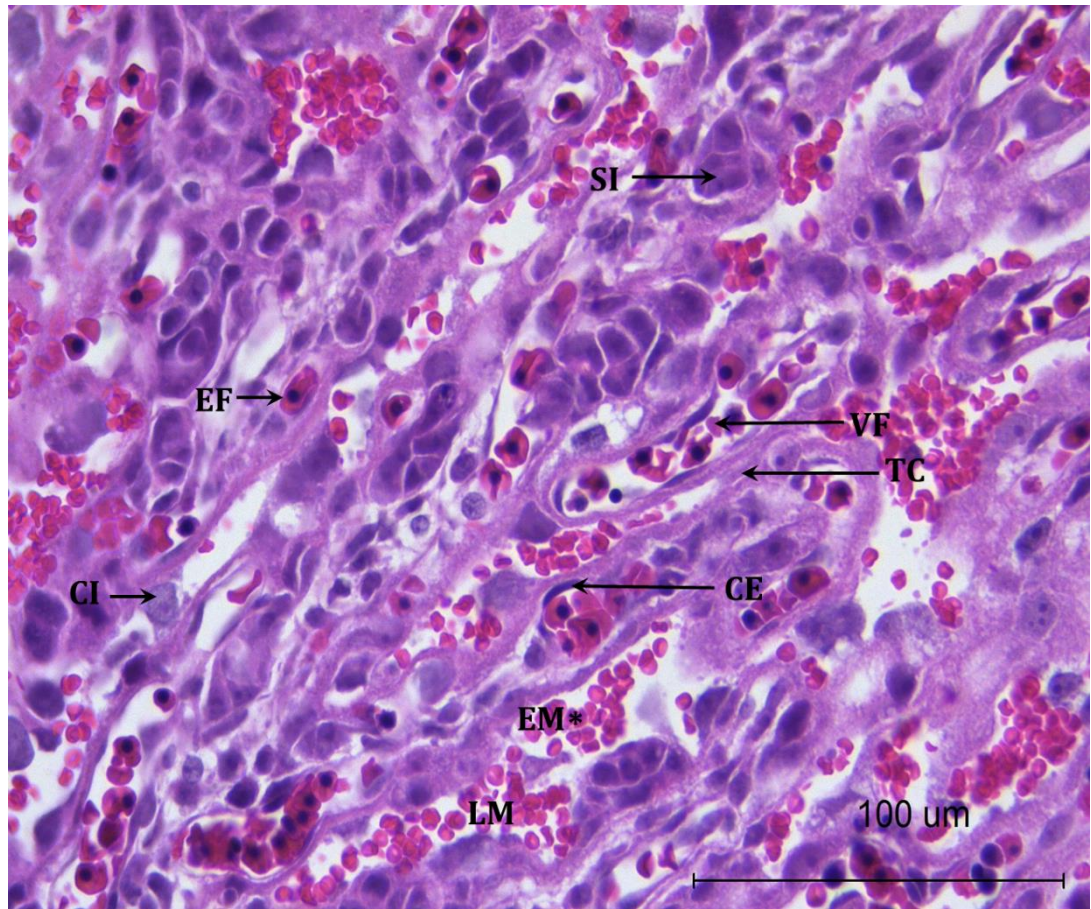


Figura 17: Componentes histológicos de la zona de laberinto.

VF: vaso fetal; EF: eritrocito fetal; CE: célula endotelial; TC: tejido conectivo; SI: sinciotrofoblasto; CI: citotrofoblasto; EM*: eritrocito materno; LM: laguna materna. Zona de intercambio íntimo del laberinto de la placenta de 16.5 dg. H&E. 40X.

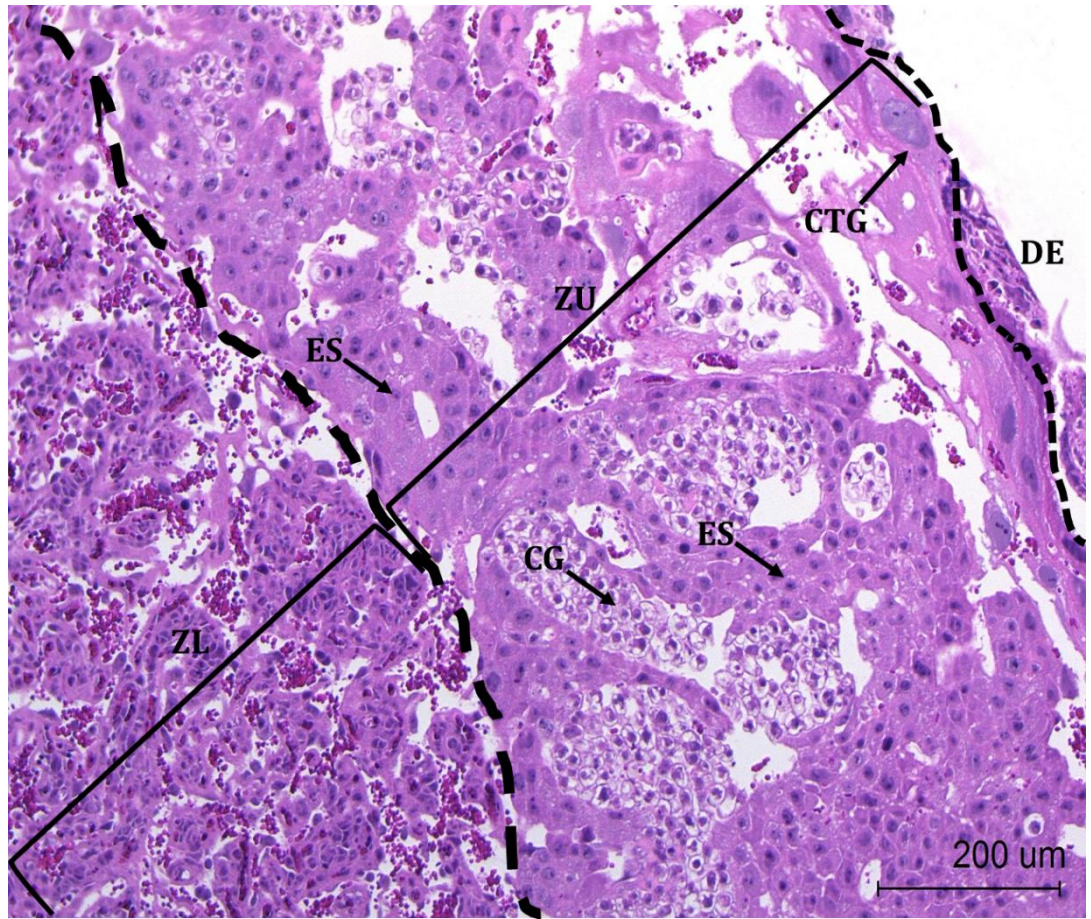


Figura 18: Ubicación y componentes celulares de la zona unión.

ZL: zona de laberinto; ZU: zona de unión; DE: decidua; ES: espongiotrofoblastos; CG: células glucogénicas; CTG: células trofoblásticas gigantes. Zona de unión de la placenta de 16.5 dg. H&E. 10X.

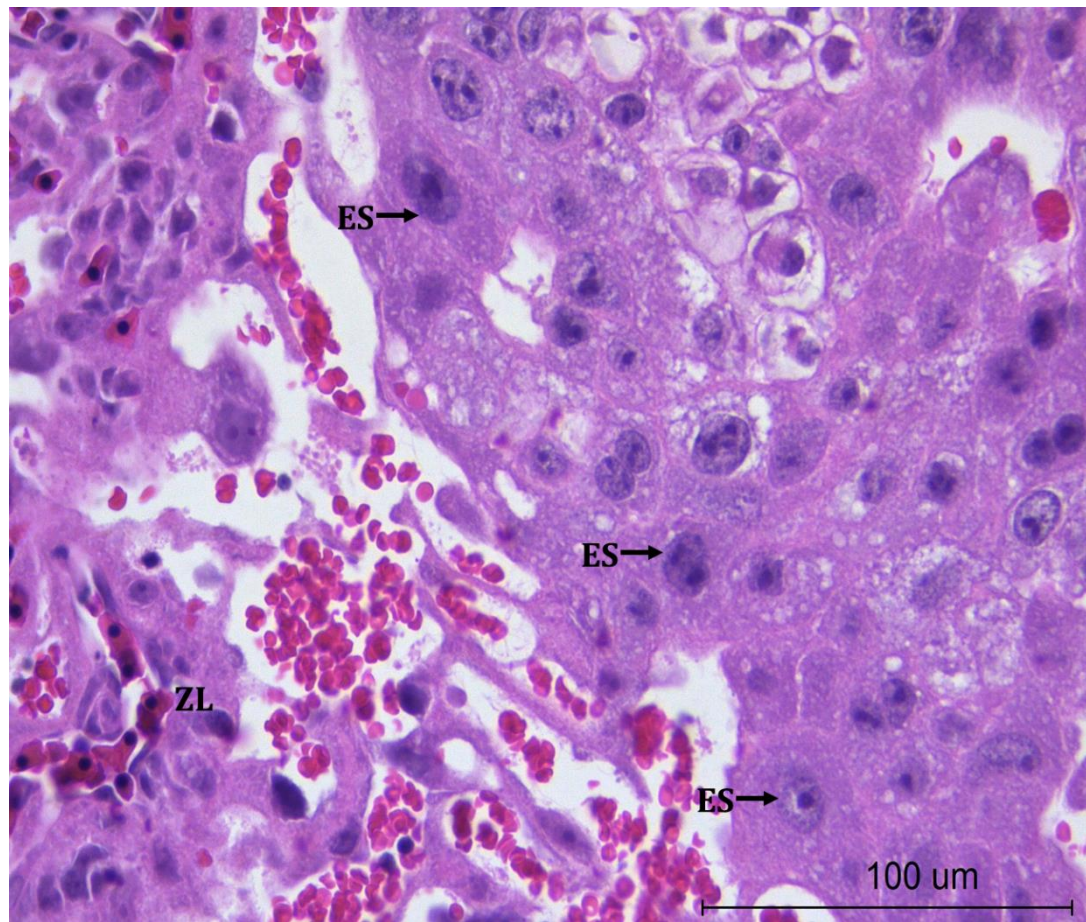


Figura 19: Espongiotrofoblastos de la zona de unión.
ZL: zona de laberinto; ES: espongiotrofoblastos. Zona de unión de la placenta de 16.5 dg.
H&E. 40X.

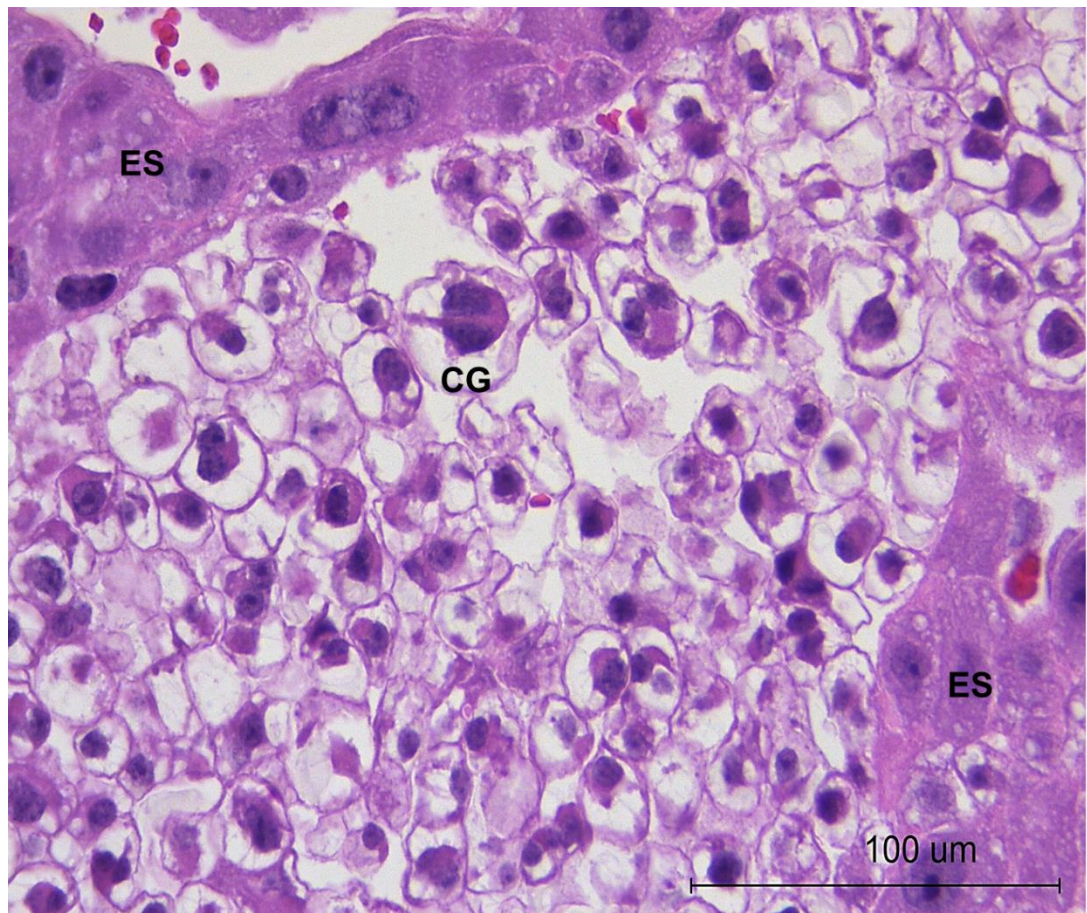


Figura 20: Células glucogénicas de la zona de unión
CG: células glucogénicas; ES: espongiotrofoblastos. Zona de unión de la placenta de 16.5 dg. H&E. 40X.

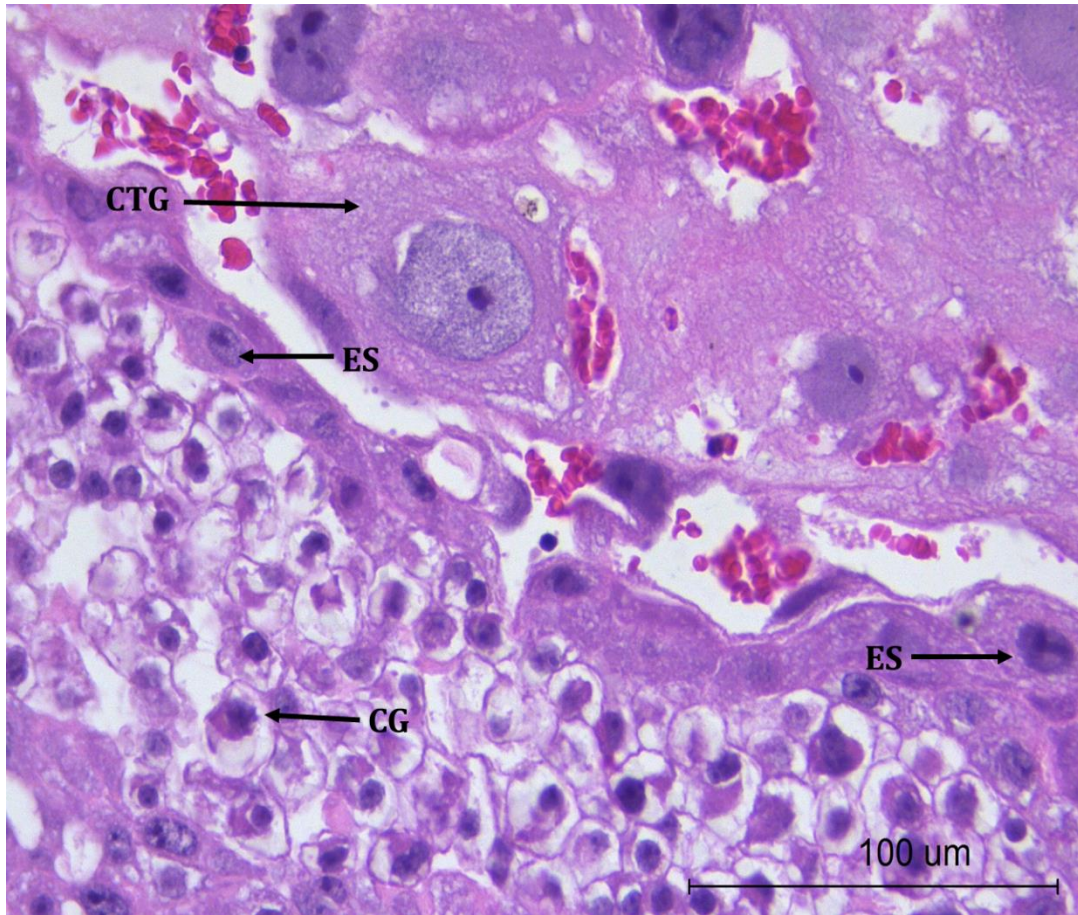


Figura 21: Células trofoblásticas gigantes de la zona de unión
CTG: células trofoblásticas gigantes; CG: células glucogénicas; ES: espongiotrofbastos.
Zona de unión de la placenta de 16.5 dg. H&E. 40X.

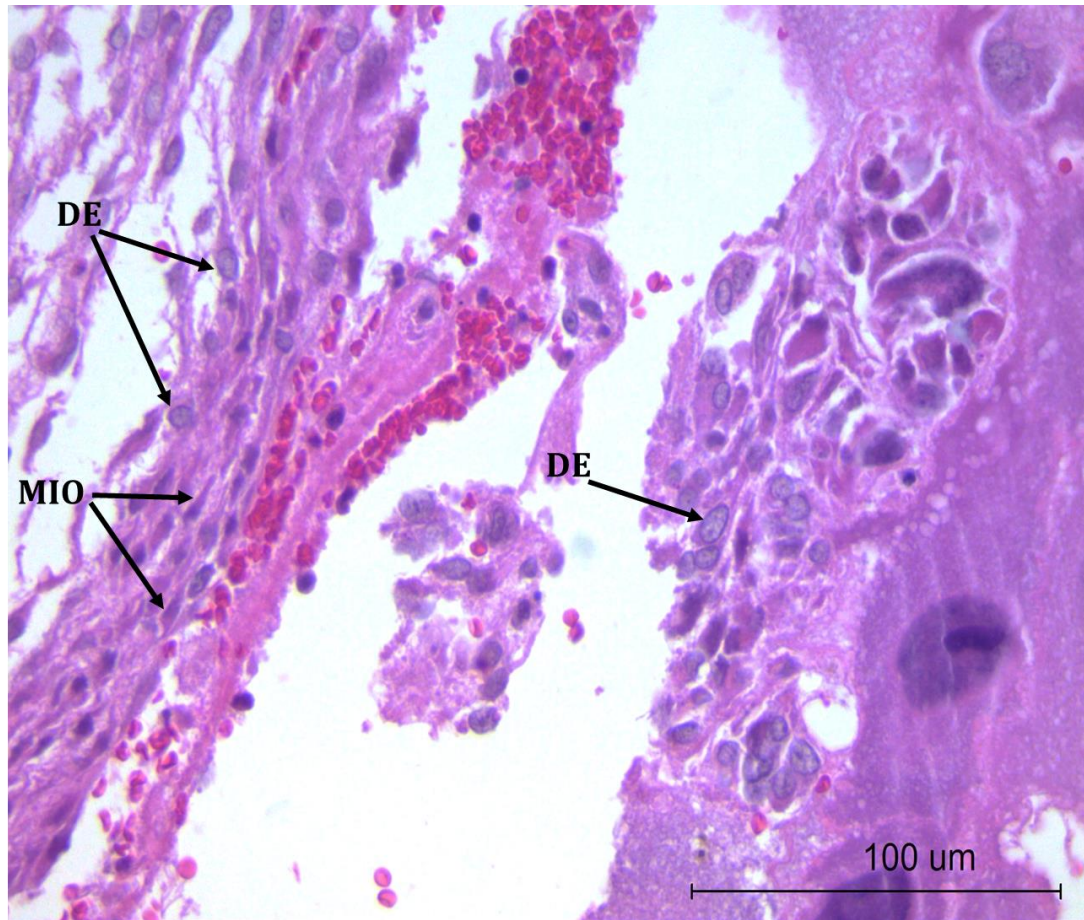


Figura 22: Células de la decidua materna.
MIO: miocitos lisos; DE: células deciduales. Zona de decidua de la placenta de 16.5 dg.
H&E. 40X.

La constitución histológica de las zonas placentarias fue similar en ambos grupos estudiados (Fig. 23, Fig. 24). En los dos grupos de estudio se encontró presencia de pequeños depósitos fibrinoides debajo de la placa coriónica y entre la zona de unión y la decidua (Fig. 24, Fig. 25).

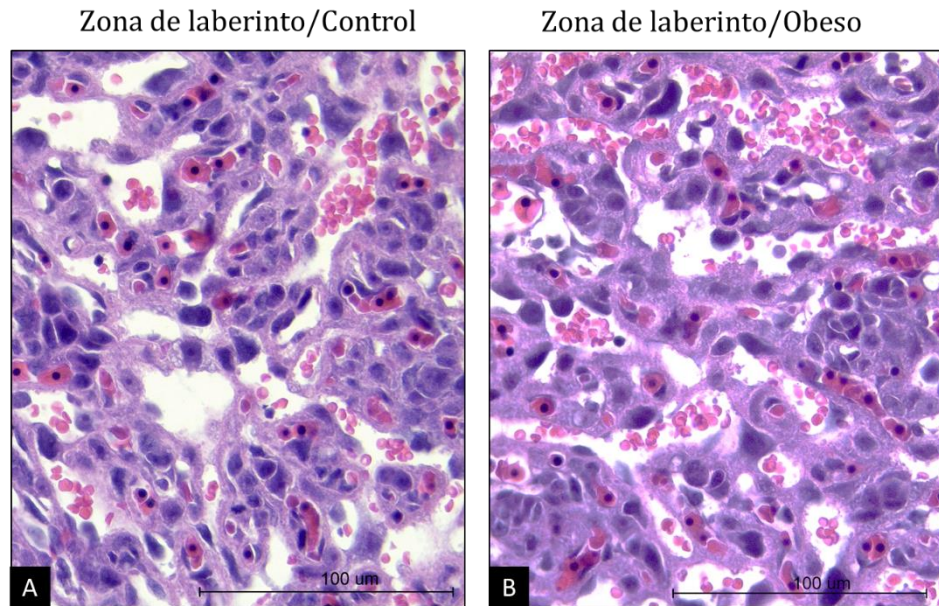


Figura 23: Zona de laberinto. Comparación entre el grupo control y obeso. A. Grupo control. B. grupo obeso. Zona de laberinto, placenta de 16.5 dg. H&E. 40X.

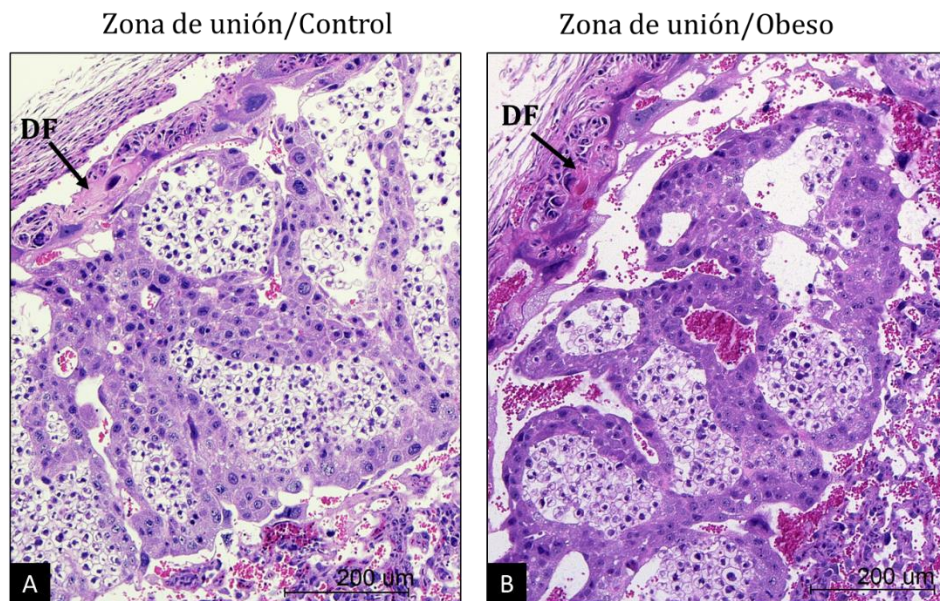


Figura 24: Zona de unión. Comparación entre el grupo control y obeso. A. Grupo control. B. grupo obeso. DF: depósitos fibrinoides. Zona de unión, placenta de 16.5 dg. H&E. 40X

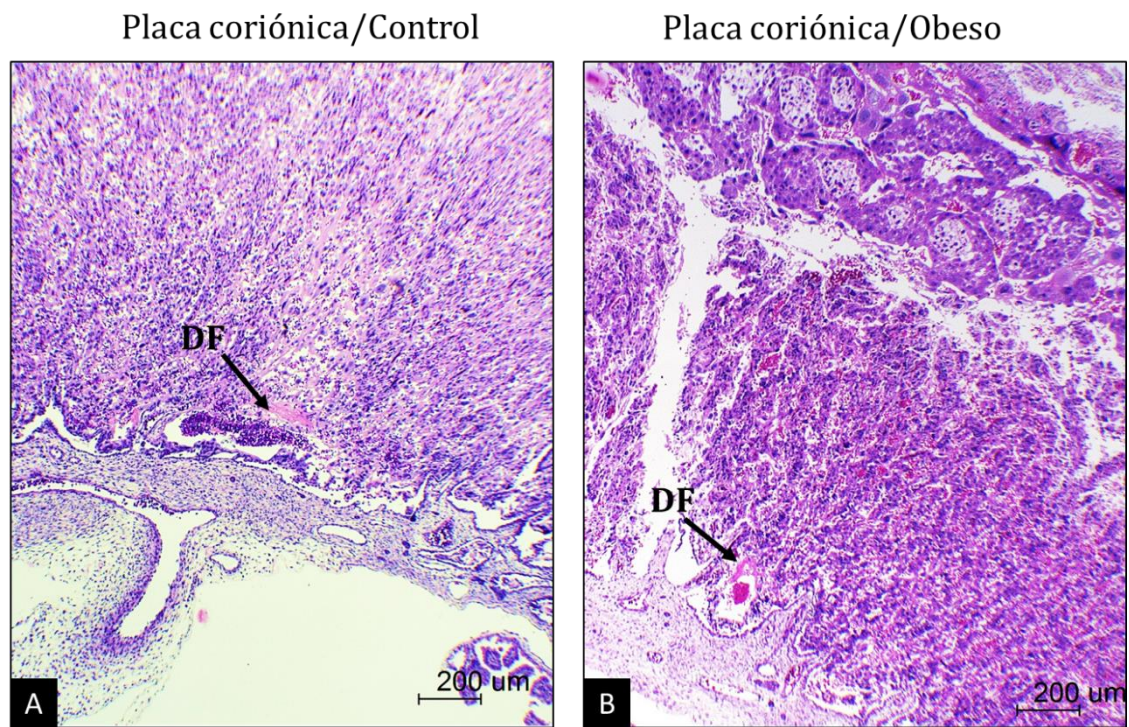


Figura 25: Placa coriónica. Comparación entre el grupo control y obeso. A. Grupo control. B. grupo obeso. DF: depósitos fibrinoides. Placa coriónica, placenta de 16.5 dg. H&E. 4X.

5.2 Evaluación de las dimensiones microscópicas de la placenta

El análisis de las variables microscópicas placentarias correspondientes grosor placentario central (**GC**: $2717 \pm 141 \mu\text{m}$; **GO**: $2682 \pm 86 \mu\text{m}$; ns), grosor central de la zona del laberinto (**GC**: $1559 \pm 61 \mu\text{m}$; **GO**: $1633 \pm 50 \mu\text{m}$; ns), área placentaria total (**GC**: $2.141 \times 10^7 \pm 0.915 \times 10^7 \mu\text{m}^2$; **GO**: $1.959 \times 10^7 \pm 0.519 \times 10^7 \mu\text{m}^2$; ns), y área de la zona del laberinto (**GC**: $1.057 \times 10^7 \pm 0.589 \times 10^7 \mu\text{m}^2$; **GO**: $1.081 \times 10^7 \pm 0.247 \times 10^7 \mu\text{m}^2$; ns), según la prueba estadística de t-Student no mostraron diferencias significativas entre los grupos control y obeso (Fig.26-29).

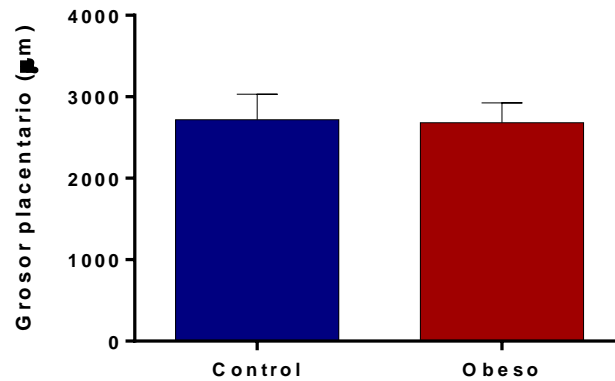


Figura 26: Comparación del grosor central placentas grupo control y grupo obesas. El grosor central se indica en micras (μm). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

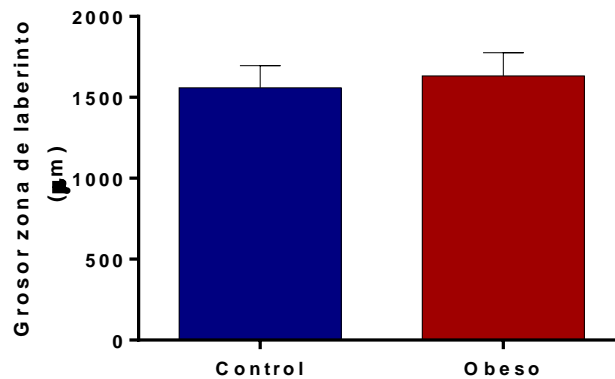


Figura 27: Comparación del grosor central de la zona de laberinto en placentas grupo control y obeso. El grosor del laberinto se indica en micras (μm). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

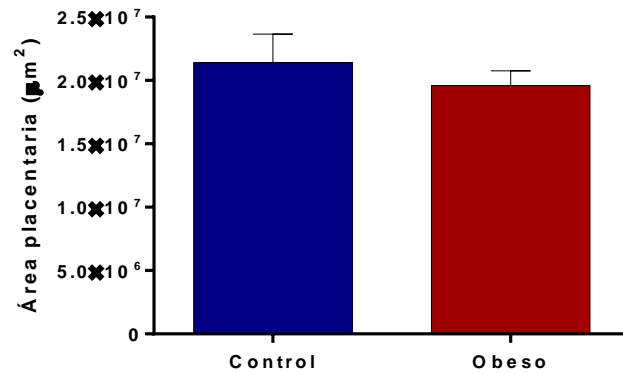


Figura 28: Comparación del área placentaria grupo control y obeso. El área placentaria se indica en micras cuadradas (μm^2). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

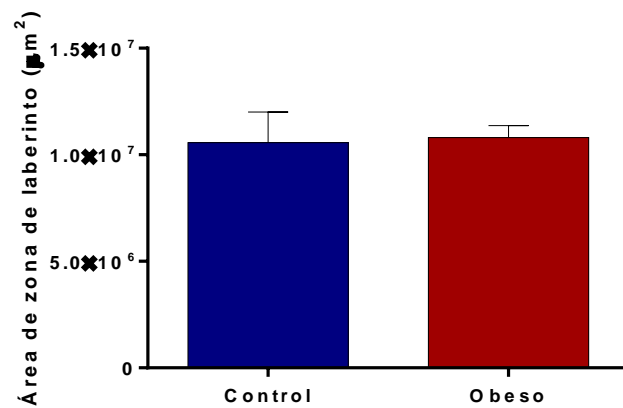


Figura 29: Comparación del área del laberinto placentario grupo control y obeso. El área del laberinto se indica en micras cuadradas (μm^2). Los datos se representan como la media \pm EE; T-test. ns.

III. RECUESTO DE VASOS FETALES EN EL LABERINTO PLACENTARIO

1. Unidad de análisis

Muestras histológicas inmunomarcadas con anti-CD31 (marcador de células endoteliales) y anti α -actina (marcador de pericitos y miocitos lisos).

2. Criterio de inclusión

Se escogieron para el análisis las muestras que no presentaron daños extensos en la zona de laberinto producto del procesamiento mediante técnica inmunohistoquímica.

3. Criterio de exclusión

Se excluyeron del análisis las muestras con una inmunomarcación inadecuada.

4. Protocolo de trabajo

En el desarrollo del objetivo de esta unidad, se realizó la inmunomarcación de las muestras placentarias con anti-CD31/anti α -actina y se hizo la captura de imágenes para la reconstrucción de la muestra completa. Por muestra placentaria inmunomarcada, se realizó la captura de imágenes en áreas seleccionadas del laberinto placentario, finalmente se realizó el recuento de vasos fetales utilizando las imágenes capturadas y el programa de uso gratuito, *Image J* (National Institutes of Health).

4.1 Técnica inmunohistoquímica

Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas con alcoholes grado reactivo en concentraciones decrecientes. Se realizó el bloqueo de peroxidasa endógenas, luego se procedió a la inmunomarcación con la combinación 1:1 del anticuerpo primario anti-CD31/PECAM-1 policlonal desarrollado en conejo (específico para la detección de células endoteliales) con el anticuerpo monoclonal anti- α actina desarrollado en ratón (específico para la detección de células de músculo liso y pericitos). Posterior a los lavados para retirar la combinación de anticuerpos primarios se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y al revelado empleando el sustrato diaminobencidina (DAB), (Anexo 6).

4.2 Captura y reconstrucción de imágenes

La captura de las imágenes provenientes de muestras inmunomarcadas se realizó empleando un microscopio de luz con cámara digital incorporada (Leica DM750) y el software Leica Application Suite (LASV4.7), en el cual se establecieron parámetros de captura necesarios para la obtención de una imagen de calidad (Anexo 7).

Se capturaron aproximadamente entre 55 y 65 imágenes por muestra placentaria usando el objetivo de 10X, con el fin de reconstruir en una sola imagen toda la muestra, para esto se usó la opción “Combinación de imágenes (stitching)” de la aplicación LASV4.7 (Anexo 7).

En la imagen reconstruida fueron seleccionados 18 campos de la zona del laberinto, distribuidos en tres niveles equidistantes entre sí y cada nivel constó de seis campos distribuidos a lo largo del eje mayor: nivel 1, cerca de la zona de unión (ubicación 1, 4, 7, 10, 13 y 16), nivel 2, en la parte central de la zona del laberinto (ubicación 2, 5, 8, 11, 14 y 17), y el nivel 3, cerca de la placa coriónica (ubicación 3, 6, 9, 12, 15 y 18), (Fig.30). Teniendo en cuenta la ubicación de los 18 campos numerados, se procedió a la ubicación de cada campo usando el objetivo de 40x y la posterior captura de la imagen para la realización del recuento de vasos fetales inmunomarcados.

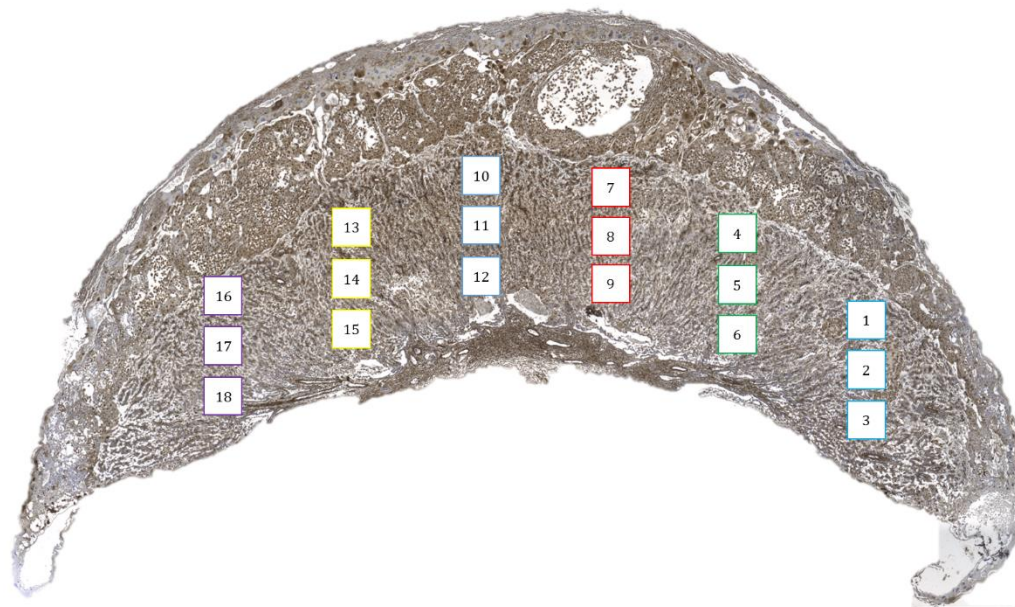


Figura 30: Distribución de los campos en la zona del laberinto de las placentas inmunomarcadas.

4.3 Variables

Una vez capturadas todas las imágenes se procedió a la determinación de las variables de número de vasos fetales por campo y al cálculo del número de vasos fetales por área placentaria de $1150313.4 \mu\text{m}^2$ (Tabla 8). El recuento de vasos fetales se realizó sobre las imágenes capturadas a 40x, con el programa *Image-J*, previa calibración (Anexo 8).

Tabla 8. Variables: Recuento de vasos fetales por campo y área.

Variable	Unidades / denominación	Tipo	Escala
Número de vasos fetales por campo de laberinto placentario	# vasos fetales /campo 40x	Cuantitativo continua	Razón
Número de vasos fetales por área de laberinto placentario	# vasos fetales/1150313.4 micrómetros cuadrados (μm^2)	Cuantitativo continua	Razón

4.3.1 Número de vasos fetales por campo de laberinto placentario

Usando la herramienta de conteo “Multi-point” del programa de análisis de imágenes, *Image-J*, se hizo el recuento de vasos fetales inmunomarcados en 18 imágenes por muestra placentaria, capturadas con el objetivo de 40x. En el recuento se incluyeron todos los vasos fetales que se observaron en el campo y que cumplieran con al menos uno de los siguientes criterios:

1. Estructura recubierta por endotelio (células epiteliales planas)
2. Estructura con presencia de eritrocitos nucleados (eritrocitos fetales)
3. Estructura delimitada por marcación citoplasmática con anti-cd31/ α -actina

El recuento se realizó por triplicado para cada campo analizado (Fig.31).

4.3.2 Número de vasos fetales por área de laberinto placentario

Cada imagen capturada con objetivo de 40x tenía $63906.3 \mu\text{m}^2$ y la suma del área de los 18 campos analizados por muestra placentaria, dio como resultado, $1150313.4 \mu\text{m}^2$. Entonces para obtener la variable “número de vasos fetales por área de laberinto placentario” se sumó el número de vasos fetales contados en los 18 campos y se expresó como número de vasos fetales por área de $1150313.4 \mu\text{m}^2$, esto se hizo con cada muestra placentaria analizada.

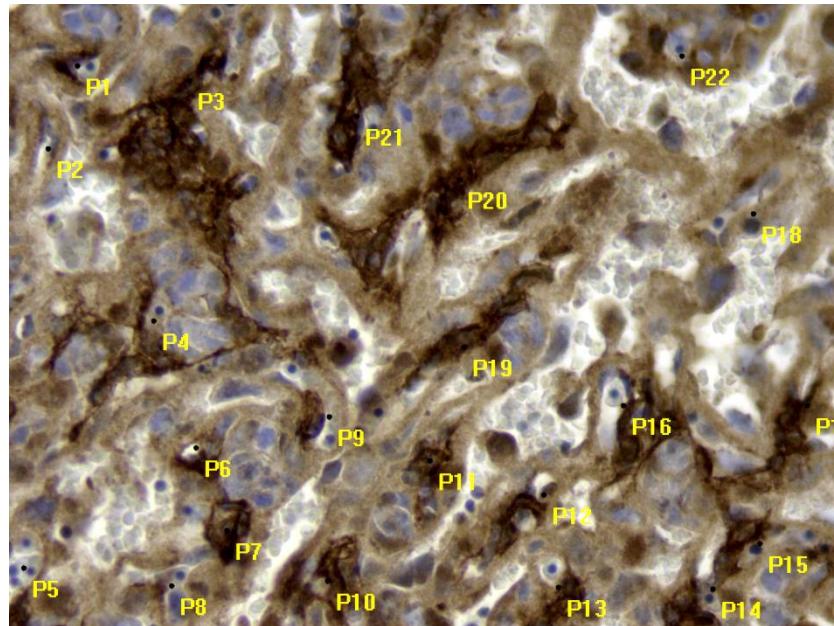


Figura 31: Recuento de vasos fetales usando la herramienta “multi point” de Image-J.

P1-22: Representan la enumeración de los vasos sanguíneos inmunomarcados.

4.4 Prueba intra e interobservador

Para estandarizar el proceso recuento de vasos fetales, se hizo una prueba intraobservador y una interobservador. Para la prueba intraobservador el investigador contó el número de vasos fetales por triplicado en las 18 fotos capturadas por zona de laberinto placentario, de todas las muestras escogidas para el análisis. Para la prueba interobservador el par investigador contó el número de vasos fetales por triplicado en tres muestras placentarias (18 fotos por muestra) por cada grupo experimental y se hizo el respectivo análisis usando la herramienta de índice de correlación intraclass del paquete estadístico SPSS 22.

4.4.1 Prueba intraobservador

La variable número de vasos fetales por campo de laberinto placentario mostró un grado de acuerdo casi perfecto, entre las tres repeticiones realizadas, según los rangos establecidos por Landis y Koch (tabla 9),(74).

Tabla 9. Prueba intraobservador de la variable, numero de vasos fetales por campo de laberinto placentario.

Variables	Índice de Correlación Intraclase	Grado de acuerdo
Número de vasos fetales por campo de laberinto placentario	0.991	Casi perfecto

4.4.2 Prueba interobservador

La variable número de vasos fetales por campo de laberinto placentario mostró un grado de acuerdo casi perfecto, entre el recuento del investigador y el par evaluador, según los rangos establecidos por Landis y Koch (tabla 10),(74).

Tabla 10. Prueba interobservador de la variable, número de vasos fetales por campo de

Variables	Índice de Correlación Intraclase	Grado de acuerdo
Número de vasos fetales por campo de laberinto placentario	0.996	Casi perfecto

laberinto placentario.

4.5 Análisis estadístico

Se usó el paquete estadístico SPSS22 para evaluar el comportamiento de las variables en cuanto a su distribución con la prueba Shapiro Wilks, verificándose el comportamiento normal de todas las variables analizadas.

Las variables fueron comparadas entre los grupos, usando el test paramétrico para comparación de medias, t-Student. Los datos se presentan para cada grupo (grupo control, GC y grupo obeso, GO) como la media \pm el error estándar (EE); las variables analizadas que mostraron diferencias significativas se acompañaron del valor P.

5. Resultados

El análisis de las variables correspondientes a número de vasos fetales por campo de laberinto placentario (GC: 26.06 ± 0.74 # vasos fetales /campo placentario de 40X; GO: 29.08 ± 0.72 # vasos fetales /campo placentario de 40X; $P=0.014$) y número de vasos fetales por área de laberinto placentario (GC: 469 ± 13 # vasos fetales /1150313.4 μm^2 ; GO: 523 ± 13 # vasos fetales /1150313.4 μm^2 ; $P=0.014$), según la prueba estadística de t-Student mostraron diferencias significativas entre los grupos control y obeso (Fig.32-34).

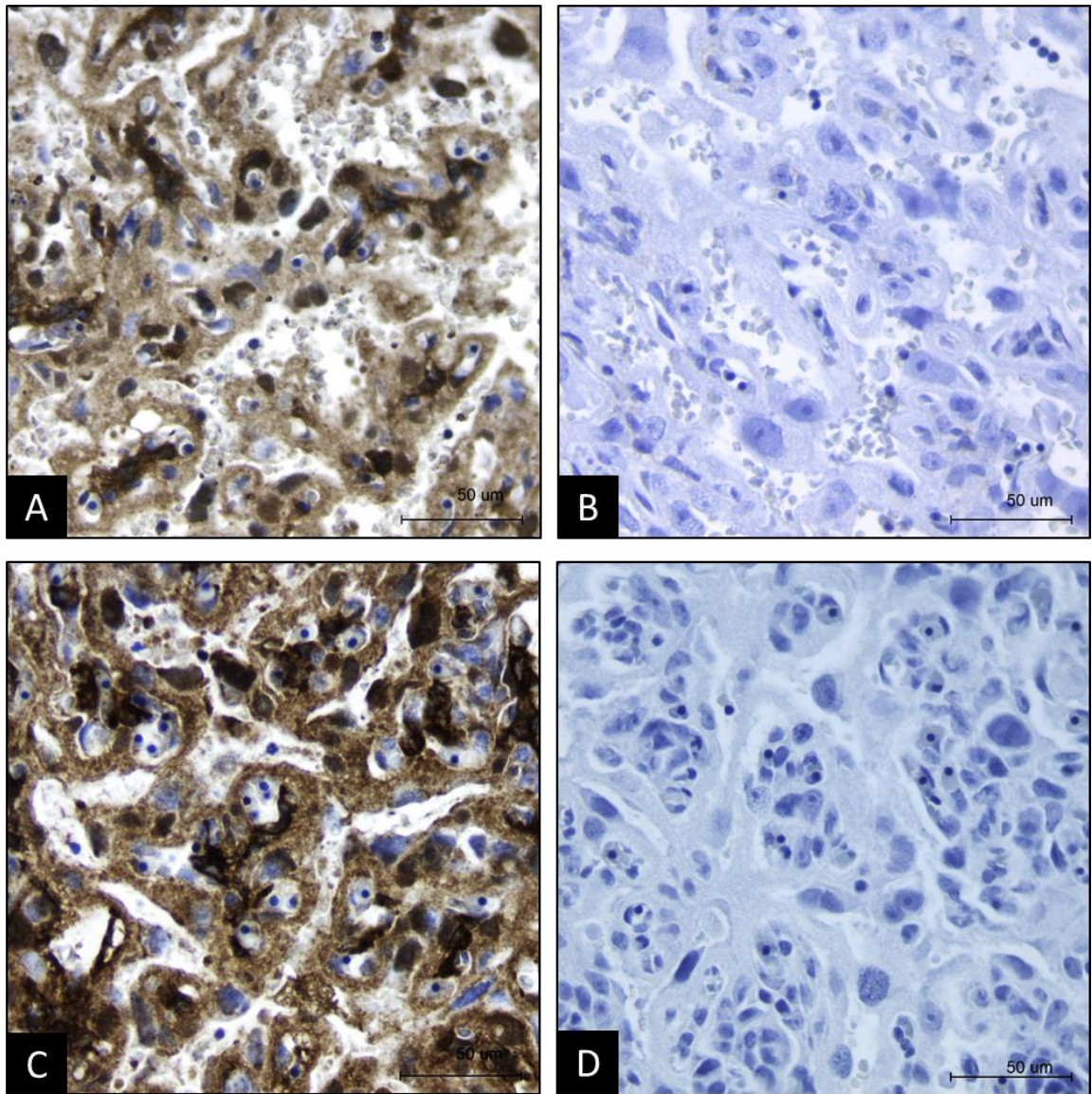


Figura 32: Inmunomarcación de vasos fetales con anti-CD31/ α -actina. Comparación entre grupos.

La inmunomarcación se observa de color marrón intenso y representa la marcación de células endoteliales hacia la luz del vaso y pericitos hacia la parte externa. A. Grupo control. B. Control negativo grupo control C. Grupo obeso. D. Control negativo grupo obeso. Zona de laberinto. 40x.

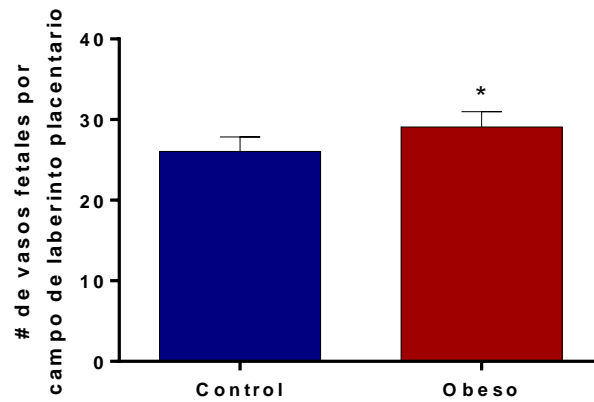


Figura 33: Comparación del número de vasos fetales por campo de laberinto placentario grupo control y obeso.

Los datos representan la media \pm EE; T-test. $P < 0.02$.

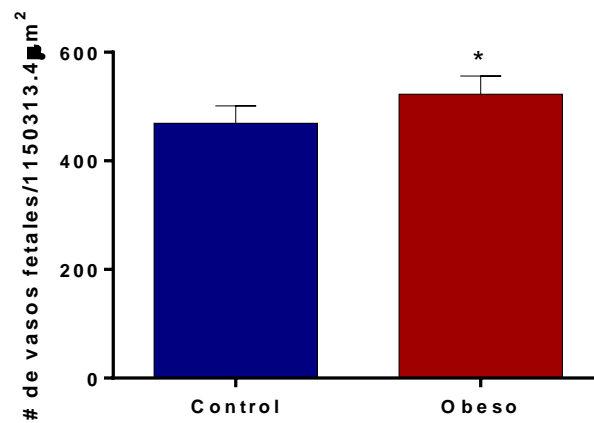


Figura 34: Comparación del número de vasos fetales por área de laberinto placentario grupo control y obeso.

Los datos representan la media \pm EE; T-test. $P < 0.02$.

10. DISCUSIÓN

La obesidad y el sobrepeso previo al embarazo, así como la ganancia excesiva de peso durante la gestación, son factores negativos relacionados con complicaciones para la gestante, el feto y neonato (33). Se ha asociado a la obesidad con mayor probabilidad de parto pre-término, pre-eclampsia, hipertensión materna, muerte intrauterina, restricción del crecimiento intrauterino, anomalías congénitas y neonatales (12,14,15). El análisis de la placenta es clave para entender el desarrollo de estas complicaciones, pues es considerada como el órgano regulador del ambiente intrauterino y su adecuada función es esencial para un embarazo exitoso (36,37). En la presente investigación se implementó un modelo de obesidad materna inducida por dieta de cafetería, previamente estandarizado *por Hidalgo S en el 2016*, para estudiar los efectos de la obesidad pre-gestacional sobre la histomorfometría placentaria (75).

La placenta es un órgano regulador del ambiente intrauterino y su adecuado funcionamiento es uno de los factores determinantes del estado nutricional fetal. El feto crece y se desarrolla a expensas de los nutrientes y oxígeno suplididos por la placenta, estos requerimientos son esenciales para el establecimiento y funcionamiento de los órganos en desarrollo, permitiendo el adecuado crecimiento fetal (73). Las propiedades intrínsecas de la placenta, el tamaño (peso), la ultraestructura, la superficie de intercambio, el grado de vascularización, la síntesis de hormonas y la abundancia de transportadores específicos; así como las extrínsecas, nutrición materna y flujo sanguíneo uterino, son determinantes en su función (36,37).

La determinación de las características morfométricas constituyen un acertado indicador de la función placentaria; la determinación del peso, brinda información sobre el tamaño de la placenta y es el resultado de la suma de dos dimensiones de crecimiento, el área de superficie y el grosor placentario.

El área de superficie, se relaciona con el crecimiento lateral y expansivo del disco coriónico. Esta variable hace referencia al área de superficie de intercambio que comúnmente se calcula usando la fórmula para encontrar el área elíptica, para esto se requiere determinar tanto diámetro mayor como menor. El diámetro mayor placentario se organiza siguiendo el eje céfalo-caudal del feto; mientras que el diámetro menor se relaciona con el paso de nutrientes hacia este. El crecimiento del área placentaria a expensas de esta última variable, permite compensar la malnutrición fetal (72,73).

El grosor placentario es una variable que brinda información sobre la arborización de la zona de intercambio vellosa; mientras que el volumen placentario, es una variable que brinda la misma información que el peso placentario, puesto que se calcula con el área de superficie y con el grosor placentario (72,73).

Al revisar trabajos relacionados con la estructura placentaria en modelos de obesidad, únicamente tienen en cuenta el peso placentario como variable morfométrica macroscópica, a diferencia del presente estudio donde se introdujo un mayor número de variables para esta caracterización, las cuales incluyeron además del peso, el volumen placentario, el diámetro mayor, el diámetro menor, el área de superficie y el grosor; de esta forma se amplía la identificación de alteraciones iniciales en la estructura histológica placentaria (73).

En la placentación de la rata se identifican tres periodos: 1-la etapa temprana, entre los días sexto y 12^{do} de gestación, 2- la etapa media, a partir de la primera invasión trofoblástica de las arterias espirales, se caracteriza por la proliferación y diferenciación celular y 3-la etapa tardía que se establece, según algunos autores, a partir del día 15 de gestación; para este periodo la estructura placentaria está definida y su proceso de maduración continúa con la expansión a expensas del crecimiento hipertrófico (76,77). El presente estudio se sitúa en el análisis de la placenta en el estadio 16.5 de gestación, es decir al inicio de la etapa tardía.

Las variables macroscópicas placentarias analizadas en este trabajo, no presentaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo obeso, estos resultados coinciden con los estudios realizados, por *Mark y cols. en 2011, Hayes y cols. en 2012 y Song y cols. en 2017*, en los cuales no se encontró diferencias significativas en el peso placentario entre los grupos analizados, en edad gestacional tardía; a diferencia de los reportes realizados por los grupos de *Akyol y cols. en 2009, Reynolds y cols. en 2015, Crew y cols. en y Mumme y cols. en 2016*, quienes encontraron disminución del peso placentario en el grupo obeso, comparado con el grupo control (19–21,23,24,67,68). Por otro lado, *Ye y cols. en 2017*, reportaron aumento del peso placentario en el grupo obeso (78). En la tabla 11 se muestra el comportamiento del peso placentario respecto al grupo control, en estudios comparativos sobre los efectos de la obesidad en la placenta (tabla 11).

Tabla 11. Comportamiento del peso placentario respecto al grupo control, en estudios de los efectos de la obesidad sobre la placenta

Autor	Biomodelo	Edad gestacional (día coito)	Peso
<i>Muñoz y cols. 2018</i>	RW	16. 5 (0.5)	↔
<i>Mark y cols. 2011</i>	RW	21 (1)	↔
<i>Hayes y cols. 2012</i>	RSD	15 (0)	↔
		18 (0)	↔
<i>Song y cols. 2017</i>	RSD	21	↔
<i>Akyol y cols. 2009</i>	RW	20	↓
<i>Crew y cols. 2016</i>	RW	21 (1)	↓
<i>Reynolds y cols. 2015</i>	RSD	18 (1)	↓
<i>Mumme y cols. 2016</i>	RSD	18 (1)	↓
<i>Ye y cols. 2017</i>	RSD	21 (0)	↑

RW: Rata Wistar; RSD: Rata Sprague-Dawley. No diferencias (↔), disminución (↓), aumento (↑).

El análisis morfométrico microscópico realizado en el presente estudio, incluyó el reconocimiento de la organización histológica de las zonas placentarias, considerando las variables área placentaria, área de zona de laberinto, grosor central placentario y grosor central de la zona del laberinto. A diferencia de las investigaciones realizadas por *Mark y cols. 2011*; *Hayes y cols. 2012*, *Reynolds y cols. 2015*; *Crew y cols. 2016*; *Song y cols. 2017*, cuyos enfoques no son de tipo histológico sino funcional (20,21,23,24,67).

En la placenta de 16.5 dg, se observa una completa definición estructural de tres zonas definidas histológicamente como, 1) zona del laberinto, 2) zona de unión y 3) zona de decidua. Al realizar la comparación de estas zonas entre ambos grupos, incluyendo las características citológicas, no se encontraron diferencias a nivel de microscopia de luz (29,52). Ambos grupos presentaron pequeños depósitos fibrinoides cerca de la placa coriónica y la decidua, que en la proporción encontrada no tienen significado clínico importante (38,79). Estos hallazgos no se pudieron comparar con estudios reportados previamente, ya que el análisis placentario en el grupo obeso, se centra en la morfometría placentaria y la expresión de diferentes marcadores genéticos, relacionados con procesos de diferenciación, apoptosis, migración, inflamación, hipoxia, angiogénesis, estrés oxidativo y transportadores transplacentarios, más no incluyen la caracterización histológica (20,21,23,67,80).

Al revisar los reportes entregados sobre estructura de la placenta proveniente de mujeres obesas, se evidencian diferentes alteraciones cuando la población analizada es sustancialmente alta (59,61,63,64); sin embargo en estudios donde se incluyen pocos casos, se reduce la posibilidad de encontrar alteraciones. En los estudios retrospectivos con altos números de casos, muestran lesiones inflamatorias materna y fetales (villitis, intervillitis, decidualitis, infiltración neutrofílica fetal), lesiones vasculares de origen materno (hiperplasia de la túnica muscular), lesiones vasculares fetales (vasodilatación, hipercapilarización, trombosis,

enfermedad fetal oclusiva), lesiones vellosas (vellosidades inmaduras de gran tamaño, vellosidades intermedias inmaduras, vellosidades intermedias maduras poco desarrolladas, vellosidades fibróticas, vellosidades terminales filiformes, depósitos fibrinoides, escasa arborización, lípidos en el estroma del sinciotrofoblasto de las vellosidades, aumento de la lipotoxicidad), crecimiento excesivo de la placenta e hipoxia fetal evidenciada por normoblastemia (55–64).

Las alteraciones reportadas en placentas humanas, pueden ser debidas a la inherente variabilidad de la especie y a la alta prevalencia de comorbilidades como diabetes gestacional, pre-eclampsia, e hipertensión; por lo cual, no existe claridad sobre los verdaderos factores desencadenantes de los cambios en la estructura placentaria. En este sentido, el uso de biomodelos murinos permiten estudiar los efectos de la obesidad, eliminando otros factores que puedan modificar los resultados (55,56,58,60,62,81).

En el presente estudio se observó una completa concordancia entre la organización citológica de la placenta y las mediciones microscópicas obtenidas, correspondientes a grosor central placentario, grosor de la zona del laberinto, área placentaria y área de la zona de laberinto, las cuales no presentaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo obeso. Al analizar otros estudios similares, se debe tener en cuenta que ellos no reportaron las mismas variables, centrándose principalmente en grosor y área placentaria, grosor y área de zona de laberinto; así, estos resultados coinciden parcialmente con los estudios de *Hayes y cols. en 2012* y *Song y cols. en 2017*, en cuanto al grosor placentario central; además, son similares a los hallazgos reportados por *Reynolds y cols. en 2015*, sobre el grosor de la zona del laberinto; sin embargo, son diferentes a los reportes de *Song y cols. 2017*, pues ellos encontraron disminución de esta misma zona (21,23,67).

El estudio de *Mark y cols. 2011*, no mostró diferencias significativas en el área de la zona del laberinto del grupo obeso comparado con el grupo control, mientras que *Crew y cols. 2016*, reportaron disminución del área de la zona del laberinto en el grupo obeso. Por otro lado, *Hayes y cols. 2012*, reportaron, que la obesidad materna se relaciona con el aumento del área placentaria y del área de la zona del laberinto (20,21,24). En la tabla 12 se muestran las variables microscópicas respecto al grupo control, en estudios de los efectos de la obesidad sobre la placenta (tabla 12).

Tabla 12. Comportamiento de las variables microscópicas respecto al grupo control, en estudios de los efectos de la obesidad sobre la placenta.

Autor	Biomodelo y edad gestacional (día coito)	Grosor central	Grosor zona del laberinto	Área placentaria	Área de zona de laberinto
<i>Muñoz y cols. 2018</i>	RW 16. 5 (0.5)	↔	↔	↔	↔
<i>Mark y cols. 2011</i>	RW 21(1)				↔
<i>Reynolds y cols. 2015</i>	RSD 18 (1)		↔		
<i>Song y cols. 2017</i>	21	↔	↓		
<i>Hayes y cols. 2012</i>	RSD 15 (0) RSD 18 (0)			↑ ↑	↑ ↑
<i>Crew y cols. 2016</i>	RW 21 (1)				↓

RW: Rata Wistar; RSD: Rata Sprague-Dawley. No diferencias (↔), disminución (↓), aumento (↑).

Para explicar la variabilidad en el comportamiento de los resultados de las mediciones macro y microscópicas entre las diferentes investigaciones y el presente trabajo, se deben tener en cuenta factores como, los protocolos utilizados en el establecimiento de la obesidad pues estos difieren en el tipo, composición y duración de la dieta; en la cepa utilizada y en la edad de inicio de alimentación del biomodelo (19,67,78). En la tabla 13, se muestran los diferentes protocolos utilizados por los investigadores cuyos estudios se compararon con el presente trabajo, donde se resalta que este empleo una dieta de cafetería complementada con dieta estándar, suministrada durante seis semanas en el periodo pregestacional y fue mantenida durante la gestación (tabla 13).

Tabla 13. Protocolos de inducción de obesidad materna

Autor	Tipo de dieta	% grasa	% carbohidratos	% Proteínas	Edad de inicio	Duración de la dieta
<i>Muñoz y cols. 2018</i> RW	CAF + SD	↑	↑	↓	60 días	6 semanas pregestacional gestacional
<i>Mark y cols. 2011</i> RW	HF	41	35	20	100 días	Gestacional
<i>Hayes y cols. 2012</i> RSD	HF	45	35	20	21 días	19 semanas pregestacional
<i>Song y cols. 2017</i> RSD	HF	60	20	20	2 dg	Gestacional
<i>Akyol y cols. 2009</i> RW	CAF + SD	↑	↓	↓	21 días	8 semanas pregestacional gestacional
<i>Crew y cols. 2016</i> RW	CAF + SD	41	47	12	21 días	8 semanas pregestacional gestacional
<i>Reynolds y cols. 2015</i> RSD	HF	45	35	20	90 días	3 semanas pregestacional gestacional
<i>Mumme y cols. 2016</i> RSD	HF	45	¿?	¿?	90 días	3 semanas pregestacional gestacional
<i>Ye y cols. 2017</i> RSD	HF	45	¿?	¿?	42 días	8 semanas pregestacional gestacional

RW: Rata Wistar; RSD: Rata Sprague-Dawley; CAF: Dieta de cafetería; SD: Dieta estándar; HF: Dieta alta en grasas; ¿?: No dato.

En este estudio, si bien no se hallaron alteraciones aparentes en la morfometría placentaria macro y microscópica, se logró evidenciar el aumento de la densidad de vasos fetales en el laberinto placentario, datos que concuerdan con los hallazgos de *Hayes y Cols. en el 2012*, quienes reportaron el mismo aumento en placentas de 15 dg. Sin embargo, este mismo estudio al analizar placentas de 18 dg informó que no hubo variación en la densidad de vasos fetales en ambos grupos (21).

El aumento de vasos fetales en estos estadios se podría explicar al analizar el compromiso de mediadores proinflamatorios en la placenta ante la obesidad; donde factores como IL-1 β (interleucina 1 beta), TNF α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-6 (interleucina 6), CD68 (marcador de macrófagos), MCP-1 (proteína quimio táctica de monocitos 1) se elevan; este incremento puede llegar a alterar la migración trofoblástica y por consiguiente la remodelación de las arterias espirales mediada por células Natural Killer uterinas (uNKs) quienes constituyen la población más

abundante en la gestación temprana y se relacionan con la deciduización y angiogénesis del sitio de implantación. Varios grupos de investigación han observado disminución de la actividad de estas células en las placentas del grupo obeso, comprometiendo de esta forma la vascularización placentaria, con el riesgo aumentado de pre-eclampsia e hipertensión. Al ocurrir esta falla en la remodelación arterial, los vasos maternos conservarían la actividad contráctil ocasionando una disminución del flujo sanguíneo (80,82–84).

El aumento de la densidad de los vasos fetales en el laberinto placentario, podría ser una repuesta compensatoria frente al ambiente hipóxico, debido a que en estados de hipoxia se evidencia el aumento en la expresión de marcadores de angiogénesis, tipo VEGF (factor de crecimiento vasculoendotelial), (21–23,28,69,80,82–85).

Hayes y cols. en 2012, muestran que al final de la gestación, la densidad de vasos fetales es similar en ambos grupos (obeso y control), a pesar de encontrar diferencias en estadios anteriores, sin embargo se debe tener en cuenta que ya sucedió una compensación de la falla inicial, probablemente a expensas de la segunda migración de trofoblasto hacia los vasos maternos, completando la remodelación. Se debe considerar que si bien la placenta al final de la gestación puede llegar a compensar su deficiencia estructural, el feto estuvo expuesto a una etapa de restricción de nutrientes y oxígeno, que podrían afectar el desarrollo normal de los órganos fetales y generar predisposición a presentar defectos funcionales en la vida posnatal; en investigaciones previas del grupo de Tejidos blandos y mineralizados (Teblami), al utilizar el mismo biomodelo y un protocolo similar de suministro de dieta encontraron que si bien no hubo variación en el peso placentario y fetal, se presentaron malformaciones en el desarrollo de las cámaras cardíacas, con evidente disminución de la apoptosis en el tabique interventricular en corazones fetales procedentes de madres obesas (16). En estudio posterior, sobre esta misma población, *El-Sharkawy y cols. en 2015*, mostraron cambios en la expresión de proteínas reguladoras de la matriz extracelular en el corazón en desarrollo en fetos de madres obesas y *Cuellar en 2016*, encontró alteraciones en la expresión en estas proteínas relacionadas con el desarrollo del paladar en fetos de madres obesas, indicando una clara incidencia del ambiente obesogénico materno sobre el desarrollo de los órganos fetales (17,86).

Al revisar los efectos de la obesidad sobre el órgano placentario reportados en diferentes investigaciones, se evidencia un comportamiento compensatorio de la placenta, para contrarrestar los efectos de la obesidad sobre la salud fetal. En el presente estudio, hubo un incremento de la densidad de vasos fetales en el laberinto placentario, ya *Hayes y cols. en el 2012 y 2014*, expresaron que este incremento puede estar relacionado con un esfuerzo de la placenta para compensar la posible disminución del aporte de oxígeno y nutrientes al feto (21,80).

Si bien este trabajo evidencia un aumento de la cantidad de vasos fetales en el laberinto placentario, durante la revisión de las investigaciones relacionados con los efectos de la obesidad sobre este órgano, se encontró que otros sistemas relacionados con la función placentaria, pueden responder para suplir el déficit funcional y compensar aumentando la expresión genética de marcadores moleculares relacionadas con el transporte transplacentario, de lípidos, aminoácidos y glucosa, como la lipoproteína lipasa, el sistema de transportadores de aminoácidos N/A (SNAT) y los transportadores de glucosa (GLUT) (23,25,67). Se debe tener en cuenta que la alteración continuada de la placenta durante un estado obesogénico, en el último periodo de la gestación, puede evidenciarse con incremento en las zonas placentarias, para suplir la entrega de nutrientes al feto y evitar la restricción intrauterina del crecimiento (20,21), este incremento en las zonas placentarias, evidentemente llevaría a un aumento del peso placentario (78).

Al analizar el panorama completo de compensación placentaria se puede observar que este evento presenta unas fases asociadas al periodo de gestación, así, en la primera etapa son cambios moleculares no observables por características macroscópicas. Estos cambios moleculares se acompañan de aumento de los vasos fetales, que permiten el incremento de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno; luego, si el ambiente obesogénico continua, aumenta la actividad trofoblástica evidenciándose con el aumento del grosor y área de la zona del laberinto que finalmente afectan los parámetros macroscópicos (20,21,23,25,27,57,60,61,63,67,73,78,80,84).

Algunos autores como *Akyol y cols. en 2009*, *Crew y cols. en 2016*, *Mumme y cols. en 2016* y *Reynolds y cols. 2015*, en sus hallazgos manifiestan que ante la obesidad, el efecto es contrario a lo observado por *Mark y cols. en 2011*, *Hayes y cols. 2012*, *Song y cols. 2017* y el presente trabajo, dónde la consecuencia de ella, es una disminución en el peso y áreas placentarias asociados con la disminución en la proliferación del trofoblasto, por alteración de los factores de crecimiento asociados (19–21,23,24,67,68).

Finalmente, la ausencia de alteraciones histomorfológicas aparentes no descarta que la placenta pueda presentar daños en las zona de decidua, además de los daños establecidos en la zona de laberinto, relacionados con constitución de la barrera placentaria, en la expresión de transportadores de nutrientes y déficit de oxígeno en el laberinto; todos estos factores podrían relacionarse con la disminución de la eficiencia placentaria e impactar directamente el desarrollo fetal y llevar hasta la interrupción de la gestación (20,21,67,69,80); por lo cual es necesario avanzar en el estudio de la barrera placentaria, estructura de la zona del laberinto y zona de decidua.

11.CONCLUSIÓN

En el día 16.5 dg del proceso de placentación, fase inicial del periodo tardío, no se evidenciaron alteraciones placentarias macroscópicas, sin embargo los cambios histológicos a nivel del número de vasos fetales, reflejan fallas en la región de la zona del laberinto, sitio fundamental para el intercambio sanguíneo materno-fetal y pudiendo como consecuencia impactar negativamente en el desarrollo fetal.

12. PERSPECTIVAS

La obesidad es una pandemia, que va en aumento y prevalece en un alto grado de mujeres en edad reproductiva, por lo cual es importante seguir indagando sobre los efectos que la obesidad pueda tener sobre la placenta, y profundizar en los hallazgos de esta investigación mediante el desarrollo de propuestas de investigación que empleen herramientas de estudio y técnicas complementarias, que permitan analizar la expresión de los sistemas de transporte de aminoácidos, lípidos y glucosa; evaluar la ultraestructura de la barrera placentaria y determinar el estado de hipoxia y estrés oxidativo.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Obesidad y sobrepeso [Internet]. 2017 [cited 2018 Jun 18]. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. World Health Organization (WHO). Obesity among women [Internet]. 2013. Available from: http://www.who.int/gho/urban_health/physiological-risk-factors/women_obesity/en/
3. Li N, Liu E, Guo J, Pan L, Li B, Wang P, et al. Maternal Prepregnancy Body Mass Index and Gestational Weight Gain on Offspring Overweight in Early Infancy. PLoS One. 2013;8(10):1–9.
4. San Román Diego A. Aumento del peso durante el embarazo. Modificaciones fisiológicas relacionadas con la ganancia de peso y necesidades nutricionales [Internet]. Universidad de Cantabria; 2013. Available from: <http://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/3948/SanRomanDiegoMA.pdf?sequence=1>
5. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. Pediatrics [Internet]. 2005;115(3):e290–6. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2004-1808>
6. Reynolds RM, Allan KM, Edwin A. Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring : follow-up of 1 323 275 person years. BMJ. 2013;347:1–10.
7. Carlson B. Embriología humana y biología del desarrollo. 5th ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
8. Barceló A, Varela G, Cafiero E, Cotelea S, Orduñez P, Luciani S. Métodos poblacionales e individuales para la prevención y el tratamiento de la diabetes y la obesidad [Internet]. Montreal: Organización Panamericana de la Salud; 2009. 53 p. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=15558&Itemid=270
9. Ministerio de Salud y de la Protección Social, Colombia. Resultados de la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional (ENSIN 2015) [Internet]. 2017. Available from: <https://www.nocomasmentiras.org/wp->

content/uploads/2017/12/Resultados-ENSIN-2015.pdf

10. Fonseca Z, Heredia A, Ocampo R, Forero Y, Sarmiento O, Álvarez M. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010- ENSIN [Internet]. ENSIN. 2011. 1-26 p. Available from: <http://www.icbf.gov.co/portal/page/portal/Descargas1/Resumenfi.pdf>
11. Herman S, Pinzón F, Salazar L, Mayor A. Mortalidad Fetal Temprana en una institución de nivel III en Cali, Colombia. Estudio exploratorio. Rev Colomb Salud Libr [Internet]. 2016;11(1):40–7. Available from: <http://revistasoj.s.unilibrecali.edu.co/index.php/rcslibre/article/view/245/pdf6>
12. Rascusin D, Stevens B, Campbell G, Aagaard-Tillery K. Obesity and the risk and detection of fetal. Semin perinatol. 2012;36(3):213–21.
13. Schummers L, Hutcheon JA, Bodnar LM. Risk of Adverse Pregnancy Outcomes by Prepregnancy Body Mass Index: A Population-Based Study to Inform Prepregnancy Weight Loss Counseling. Obs Gynecol. 2015;125(1):133–43.
14. Tenenbaum-gavish K, Hod M. Impact of Maternal Obesity on Fetal Health. Fetal Diagn Ther. 2013;34(1):1–7.
15. Stothard KJ, Tennant PWG, Bell R. Maternal Overweight and Obesity and the Risk of Congenital Anomalies. JAMA. 2009;301(6):636–50.
16. Tejada ME. Efectos de la obesidad materna sobre el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía de la rata Wistar. Universidad del Valle- Colombia; 2016.
17. Cuéllar Rivas E. Expresión de proteínas moduladoras de matriz extracelular en el desarrollo del paladar en un modelo murino de obesidad inducida por dieta. Universidad del Valle- Colombia; 2016.
18. Gül M, Bayat N, Çetin A, Kepekçi RA, Şimşek Y, Kayhan B, et al. Histopathological, Ultrastructural and Apoptotic Changes in Diabetic Rat Placenta. Balkan Med J [Internet]. 2015;32(3):296–302. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4497697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Akyol A, Langley-Evans SC, McMullen S. Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. Br J Nutr. 2009;102(11):1601–10.
20. Mark PJ, Sisala C, Connor K, Patel R, Lewis JL, Vickers MH, et al. A maternal high-fat diet in rat pregnancy reduces growth of the fetus and the placental junctional zone, but not placental labyrinth zone growth. J Dev Orig Health Dis. 2011;2(01):63–70.
21. Hayes EK. The effect of lifelong maternal obesity on pregnancy outcomes and placental development [Internet]. McMaster University; 2012. Available

from: <https://macsphere.mcmaster.ca/bitstream/11375/11970/1/fulltext.pdf>

22. Kim DW, Young SL, Grattan DR, Jasoni CL, Al KIMET. Obesity During Pregnancy Disrupts Placental Morphology , Cell Proliferation , and Inflammation in a Sex-Specific Manner Across Gestation in the Mouse. *Biol Reprod.* 2014;90(6):1–11.
23. Reynolds CM, Vickers MH, Harrison CJ, Segovia SA, Gray C. Maternal high fat and / or salt consumption induces sex- specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. *Physiol Rep.* 2015;3(5):1–10.
24. Crew RC, Waddell BJ, Mark PJ. Maternal obesity induced by a “cafeteria” diet in the rat does not increase inflammation in maternal, placental or fetal tissues in late gestation. *Placenta.* 2016;39:33–40.
25. Rosario FJ, Kanai Y, Powell TL, Jansson T. Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth. *Obesity.* 2015;23(8):1663–70.
26. Panchenko PE, Voisin S, Jouin M, Jouneau L, Prézelin A, Lecoutre S, et al. Expression of epigenetic machinery genes is sensitive to maternal obesity and weight loss in relation to fetal growth in mice. *Clin Epigenetics.* 2016;8:22.
27. Farley D, Tejero ME, Comuzzie AG, Higgins PB, Cox L, Werner SL, et al. Feto-placental Adaptations to Maternal Obesity in the Baboon. *Placenta.* 2009;30(9):752–60.
28. Frias AE, Morgan TK, Evans AE, Rasanen J, Oh KY, Thornburg KL, et al. Maternal high-fat diet disturbs uteroplacental hemodynamics and increases the frequency of stillbirth in a nonhuman primate model of excess nutrition. *Endocrinology.* 2011;152(6):2456–64.
29. Soares MJ, Chakraborty D, Karim Rumi MA, Konno T, Renaud SJ. Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta.* 2012;33:233–43.
30. Chan RSM, Woo J. Prevention of overweight and obesity: How effective is the current public health approach. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(3):765–83.
31. Fortich R, Gutiérrez JD. Los determinantes de la obesidad en colombia. *Rev Econ Y Región [Internet].* 2011;5(2):155–82. Available from: [http://fundacionsanosysaludables.drupalgardens.com/sites/g/files/g1650296/f/201406/Los determinantes de la obesidad en Colombia.pdf](http://fundacionsanosysaludables.drupalgardens.com/sites/g/files/g1650296/f/201406/Los%20determinantes%20de%20la%20obesidad%20en%20Colombia.pdf)
32. NICE. Obesity : identification , assessment and management [Internet]. Londres: National Institute for Health and Care Excellence; 2014. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg189/resources/obesity->

identification-assessment-and-management-35109821097925

33. Puello E. Efectos a corto y a largo plazo de la obesidad durante el embarazo. In: Congreso Internacional de Nutriología y Obesidad [Internet]. Revista Salud Pública y Nutrición; 2007. Available from: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-15-2007/index.html>
34. Leddy MA, Power ML, Schulkin J. The Impact of Maternal Obesity on Maternal and Fetal Health. *Rev Obs Ginecol* [Internet]. 2008;1(4):170–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2621047/>
35. Musa MG, Torrens C, Clough GF. The microvasculature : a target for nutritional programming and later risk of cardio-metabolic disease. *Acta Physiol*. 2014;210:31–45.
36. Cross JC, Mickelson L. Nutritional influences on implantation and placental development. *Nutr Rev*. 2006;64(5):S12-S18; discussion S72-S91.
37. Khong TY. Placental vascular development and neonatal outcome. *Semin Neonatol*. 2004;9:255–63.
38. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the human placenta. 5th ed. New York: Springer; 2006.
39. Kurjak A, Chervenak F. Donald School. Ecografía en Obstetricia y Ginecología. 2nd ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009. 1010 p.
40. Kierszenbaum A. Histología y biología celular. 3rd ed. Barcelona: Elsevier; 2012.
41. Harris LK. Review: Trophoblast-Vascular Cell Interactions in Early Pregnancy: How to Remodel a Vessel. *Placenta*. 2010;24:s93–8.
42. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta*. 1980;1:3–19.
43. Roberts J, Bodnar LM, Patrick TE, Powers RW. The Role of Obesity in Preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2011;1(1):6–16.
44. Wang Y, Zhao S. Vascular Biology of the Placenta. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
45. Croy A, Yamada A, DeMayo F AS. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy [Internet]. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy. Amsterdam: Elsevier; 2014. 125-142 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123944450000114>
46. Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. *J Toxicol Pathol*.

2014;27:11–8.

47. Simmons DG, Cross JC. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Dev Biol.* 2005;284(1):12–24.
48. Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. In: *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2002.
49. Simmons DG, Fortier AL, Cross JC. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Dev Biol.* 2007;304:567–78.
50. Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn.* 2006;235:3280–94.
51. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet.* 2001;2(7):538–48.
52. Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, Abe M, Hagio S, Ogawa I. Toxicological Pathology in the Rat Placenta. *J Toxicol Pathol.* 2011;24:95–111.
53. Rai A, Cross JC. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Dev Biol.* 2014;387:131–41.
54. Treuting P, Dintzis S. *Comparative Anatomy and Histology. A mouse and Human Atlas.* Oxford: Academic; 2012.
55. Roberts KA, Riley SC, Reynolds RM, Barr S, Evans M, Statham A, et al. Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. *Placenta.* 2011;32:247–54.
56. Bar J, Schreiber L, Saruhanov E, Ben-Haroush A, Golan A, Kovo M. Placental histopathological findings in obese and nonobese women with complicated and uncomplicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286:1343–7.
57. Castejón OC, López AJ. A light and scanning electron microscopy study of placental villi associated with obesity and hipertensión. *Electron J Biomed* [Internet]. 2013;2:29–36. Available from: <http://biomed.uninet.edu/2013/ElectronJBiomed2013-2.pdf>
58. Saben J, Lindsey F, Zhong Y, Thakali K, Badger TM, Andres A, et al. Maternal Obesity is Associated with a Lipotoxic Placental Environment. *Placenta.* 2014;35(3):171–7.
59. Huang L, Liu J, Feng L, Chen Y, Zhang J, Wang W. Maternal prepregnancy obesity is associated with higher risk of placental pathological lesions.

Placenta. 2014;35:563–9.

60. Loardi C, Falchetti M, Prefumo F, Facchetti F, Frusca T. Placental morphology in pregnancies associated with pregravid obesity. *J Matern Neonatal Med.* 2015;29(16):2611–6.
61. Kovo M, Zion-Saukhanov E, Schreiber L, Mevorach N, Divon M, Ben-Haroush A, et al. The Effect of Maternal Obesity on Pregnancy Outcome in Correlation with Placental Pathology. *Reprod Sci.* 2015;22(12):1643–8.
62. He M, Curran P, Raker C, Martin S, Larson L, Bourjeily G. Placental findings associated with maternal obesity at early pregnancy. *Pathol Res Pract.* 2016;212:282–7.
63. Leon-Garcia SM, Roeder HA, Nelson KK, Liao X, Pizzo DP, Laurent LC, et al. Maternal obesity and sex-specific differences in placental pathology. *Placenta.* 2016;38:33–40.
64. Bar J, Kovo M, Schreiber L, Shargorodsky M. Placental maternal and fetal vascular circulation in healthy non-obese and metabolically healthy obese pregnant women. *Atherosclerosis.* 2017;260:63–6.
65. Karakas B. Impact of a maternal high-fat diet on mouse placental epigenetic programming. Swedish University of Agricultural Science; 2011.
66. Lager S, Samulesson A-M, Taylor PD, Poston L, Powell TL, Jansson T. Diet-induced obesity in mice reduces placental efficiency and inhibits placental mTOR signaling. *Physiol Rep.* 2014;2(2):e00242.
67. Song L, Sun B, Boersma GJ, Cordner ZA, Yan J, Moran TH, et al. Prenatal high-fat diet alters placental morphology, nutrient transporter expression, and mtorc1 signaling in rat. *Obesity.* 2017;25:909–19.
68. Mumme K, Gray C, Reynolds CM, Vickers MH, Harrison CJ, Stanley JL, et al. Maternal-fetal hepatic and placental metabolome profiles are associated with reduced fetal growth in a rat model of maternal obesity. *Metabolomics.* 2016;12:83.
69. Sasson IE, Vitins AP, Mainigi MA, Moley KH, Simmons RA. Pre-gestational vs gestational exposure to maternal obesity differentially programs the offspring in mice. *Diabetologia.* 2015;58(3):615–24.
70. Institute for Laboratory Animal Research NRC. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. [Internet]. 8th ed. Washington DC: The National Academies Press; 2011. 220 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595115>
71. Leary S, Underwood W, Lilly E, Anthony R, Cartner S, Corey D, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals : 2013 Edition [Internet]. 13th ed. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association; 2013. 102 p.

Available from: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>

72. Anjankar VP, Parchand MP, Anjankar AP, Kamdi NY. Placental Morphometry in Toxaemia of Pregnancy. *SJAMS* [Internet]. 2014;2(1B):205–8. Available from: <http://saspublisher.com/wp-content/uploads/2014/03/SJAMS-21B205-208.pdf>
73. Cardoso V, Mazzitelli N, Veiga MA, Furlán R, Grandi C. Medidas del crecimiento placentario y su relación con el peso de nacimiento y la edad gestacional. Revisión bibliográfica. *Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá* [Internet]. 2012;31(2):69–74. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91224139006>
74. Mandeville PB. El coeficiente de correlación intraclase (ICC). *Cienc UANL* [Internet]. 2005;8(3):414–6. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/402/40280322.pdf>
75. Hidalgo SA. Establecimiento de un biomodelo experimental de obesidad adquirida por dieta en ratas Wistar. Universidad del Valle-Colombia; 2017.
76. Oyedele KO, Bolarinwa AF. Evaluation of antifertility and teratogenic effects of crude extracts of *Portulaca oleracea* in male and female albino rats. *Asian J Pharm Clin Res* [Internet]. 2013;6(2):217–20. Available from: <https://innovareacademics.in/journal/ajpcr/Vol6Suppl2/1747.pdf>
77. Kalisch-Smith JI, Simmons DG, Pantaleon M, Moritz KM. Sex differences in rat placental development: from pre-implantation to late gestation. *Biol Sex Differ*. 2017;8:17.
78. Ye K, Li L, Zhang D, Li Y, Wang H-Q, Lai H-L, et al. Effect of maternal obesity on fetal growth and the expression of placental fatty acid transporters. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2017;9(4):300–7.
79. Baergen R. *Manual of Pathology of the Human Placenta*. 2nd ed. New York: Springer; 2011.
80. Hayes EK, Tessier DR, Percival ME, Holloway AC, Petrik JJ, Gruslin A, et al. Trophoblast invasion and blood vessel remodeling are altered in a rat model of lifelong maternal obesity. *Reprod Sci*. 2014;21(5):648–57.
81. Mahany EB, Han X, Borges BC, Da Silveira Cruz-Machado S, Allen SJ, Garcia-Galiano D, et al. Obesity and High-Fat Diet Induce Distinct Changes in Placental Gene Expression and Pregnancy Outcome. *Endocrinology*. 2018;159(4):1718–33.
82. Parker VJ, Solano ME, Arck PC, Douglas AJ. Diet-induced obesity may affect the uterine immune environment in early-mid pregnancy, reducing NK-cell activity and potentially compromising uterine vascularization. *Int J Obes*. 2014;38:766–74.

83. Parker SE, Werler MM. Epidemiology of ischemic placental disease: A focus on preterm gestations. *Semin Perinatol.* 2014;38:133–8.
84. Tessier D. Maternal Obesity Induces a Pro- Inflammatory Uterine Immune Response Associated with Altered Utero-Placental Development and Adverse Fetal Outcomes. University of Ottawa, Canada; 2015.
85. Spradley FT, Palei AC, Granger JP. Immune mechanisms linking obesity and preeclampsia. *Biomolecules.* 2015;5:3142–76.
86. El-Sharkawy F, Pustovrh MC, Martínez D, Salazar L. Patrón de expresión de MMP-2 y TIMP-2 durante la cardiogénesis tardía en un modelo experimental de obesidad materna. In: XXVI Congreso Estudiantil Colombiano de Investigación Médica (CECIM). Cali: Universidad del Valle; 2015.

ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo para la disección del útero y obtención de placenta de rata Wistar

Introducción

La rata es un biomodelo ampliamente usado en estudios de placentación e histopatología fetal, la duración de la gestación de la rata es de 22 a 23 días, tiene en promedio 12 crías, distribuidas en los dos cuernos laterales (útero bicornio). La implantación del blastocisto en la superficie interna del útero de la rata, ocurre al día 6.0 de gestación (dg) e intervienen diversos procesos necesarios para el anclaje del blastocisto al endometrio de la superficie antimesometrial y la posterior anidación en el estroma.

En estudios relacionados con placentación, se requiere de la obtención de la unidad feto-placenta, los pasos para obtener la muestra, parten de la sedación profunda del biomodelo materno, seguido del abordaje de la cavidad abdominal y la exposición del bloque, estómago, intestinos e hígado; el cual debe ser desplazado para acceder a los órganos reproductores femeninos y finalizar con la extracción del útero. En edades gestacionales avanzadas se puede observar bultos prominentes correspondientes a los sitios de implantación ubicados en cada cuerno uterino. Cada sitio de implantación tiene en su interior, la unidad feto-placenta y membranas fetales.

Objetivo

Obtener placentas de un biomodelo murino durante gestación tardía

Muestra

Placentas de 16.5 días de gestación de rata Wistar

Elementos de protección

1. Bata
2. Gafas
3. Guantes
4. Tapabocas

Materiales

1. Tijera mediana de punta recta
2. Pinza lisa mediana
3. Pinza con garra mediana
4. Pinzas de disección de punta fina (n° 5)
5. Tijeras de microdisección (de iris)
6. Cajas Petri

7. Algodón
8. Pipeta Pasteur plástica

Equipos

1. Microscopio estereotáxico (Meiji RZT Techno)

Reactivos

1. Buffer fosfato salino (PBS)
2. PLP (peryodato, lisina, formaldehído)
3. Alcohol al 70%
4. Hipoclorito de sodio al 0.5 %

Procedimiento

A. Preparación de reactivos

Buffer Fosfato (PBS)

Solución A	Solución B
27,6 g fosfato monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) / 1000 ml agua destilada	Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) se disuelven 28.4 g / 1000 mL de agua destilada
190 mL solución A 0.2 M + 810 solución 0.2 M mL B = 1000 mL de Buffer fosfato 0.2 M pH 7.4	
1000 mL de PB 0.2 M pH 7.4 + 1000 mL de agua destilada = 2000 mL de PB 0.1 M pH 7.4	
Buffer fosfato salino (PBS): Por cada 1000 mL de PB agregar 8.9g de NaCl Verificar que el pH sea aprox. 7.34.	

Nota: Conservar a 4-8 °. Es estable por tres o más meses. Desechar si aparecen cambios de coloración o precipitados.

PLP (peryodato, lisina, formaldehído)

Reactivo	Para 1000 mL
Paraformaldehído	21.28g
Agua destilada	500 mL
NaOH 1 Normal	Gota a gota
Peryodato de sodio	1.07g
Buffer fosfato 0.2M	235 mL
Lisina	6.85g
Calentar el agua destilada a 58°C, agregar el paraformaldehído y aclarar gota a gota con NaOH 1N. Una vez frío, agregar buffer fosfato 0.2M, peryodato de sodio y finalmente la lisina. Almacenar refrigerado. Verificar que el pH sea aprox. 7.34.	

Nota: Se usan 0.4 gramos de NaOH para preparar 10mL de solución 1N.

Alcohol al 70%

Reactivo	Para 1000 mL
Etanol 96%	729.2mL
Agua destilada	270.8mL
Mezclar el etanol con el agua destilada y verificar grado de alcohol con el densitómetro.	

Hipoclorito de sodio 0.5%

Reactivo	Para 100 mL
Hipoclorito al 5.25%	9.5 mL
Agua destilada	100

B. Preparación del lugar de trabajo

Esterilizar previamente el instrumental, desinfectar el sitio de trabajo con hipoclorito al 0.5% y empapelarlo con papel craft.

C. Técnica

Extracción del útero bicorneo

Una vez dispuesto el biomodelo en el sitio de trabajo mantener anestesiado y verificar la ausencia de los reflejos plantares, pinzando los cojinetes epidérmicos de las extremidades inferiores con una pinza de garra mediana (Fig. 1). Antes de iniciar el proceso, desinfectar la zona de incisión con alcohol al 70%. Posteriormente, con pinza con garra mediana, realizar un pliegue de la piel ventral a nivel de la cavidad abdominal y realizar un corte con tijera de disección en la región umbilical, disecar los músculos y las fascias hasta exponer el útero y demás vísceras (Fig. 1 y 2). Una vez expuesta la cavidad abdominal, los órganos que no son objeto de estudio se desplazan con cuidado fuera del biomodelo, para obtener un campo de visión más amplio y con una pinza mediana punta plana se pinza el útero en el sitio de unión con el canal vaginal, se realiza un corte transversal con tijera mediana y con la pinza de punta plana se levanta el útero unido a los ovarios y se extraer de la cavidad abdominal (Fig.3). En la preñez avanzada las implantaciones ubicadas en los cuernos uterinos sobresalen entre las vísceras (Fig.4). La ubicación de las implantaciones en los cuernos uterinos es importante, por esto es necesario identificar cada cuerno, derecho o izquierdo, y enumerar las implantaciones iniciando desde el extremo caudal (implantaciones más próximas a la conexión con la vagina), hasta las cercanas al ovario (Fig.5).

Los órganos reproductores se colocan en una caja Petri con buffer fosfato salino frío o solución salina y se separan los ovarios del útero. Cada ovario se debe separar del oviducto usando un estereomicroscopio y pinzas de punta fina n°5, que permita separar los dos componentes y conservarlos sin daños estructurales (Fig 5).



Figura 1: A. Verificación de la ausencia de reflejos plantares. B. Desinfección de la zona de disección con alcohol al 70%. C. Selección del sitio de incisión.

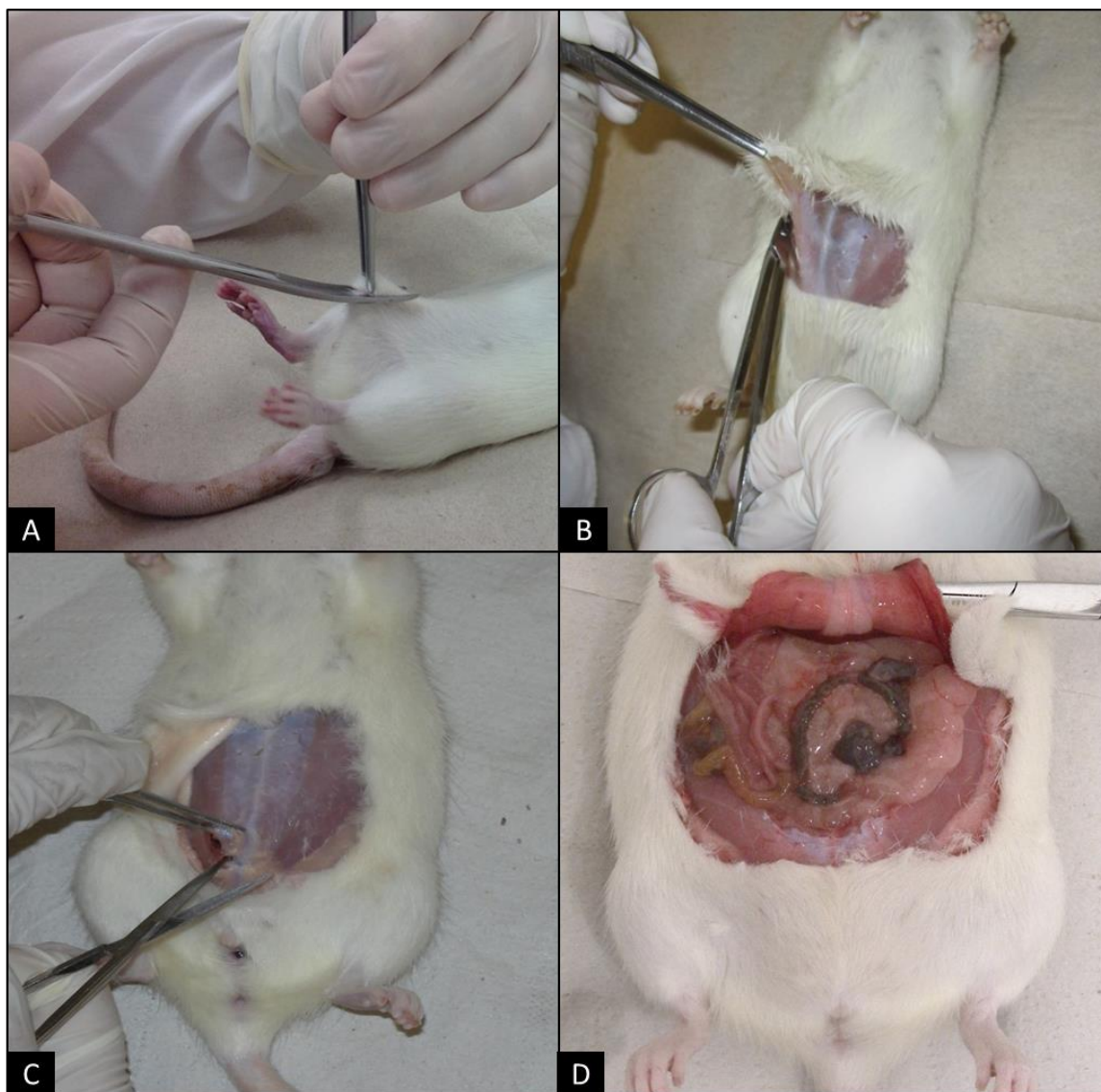


Figura 2: A. Corte a nivel de la cavidad abdominal. B. Separación y levantamiento de la piel. C. Disección de músculos y fascias. D. Exposición de las vísceras.

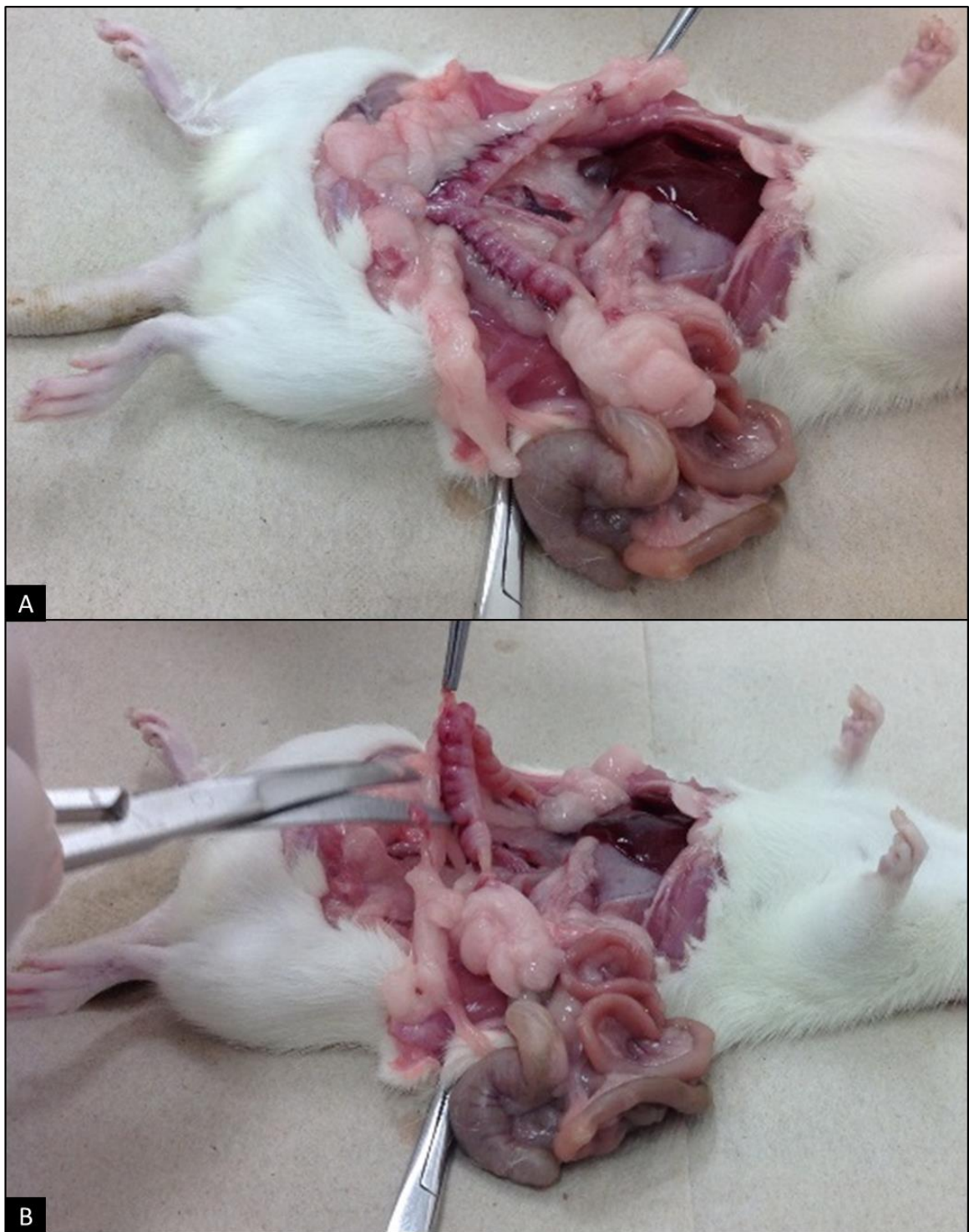


Figura 3: A. Desplazamiento de los intestinos y visualización de los órganos reproductores de interés. B. Liberación del útero del canal vaginal.



Figura 4: Implantaciones distribuidas en el útero bicorneo de la rata Wistar en estadio tardío de la gestación (16.5 dg).

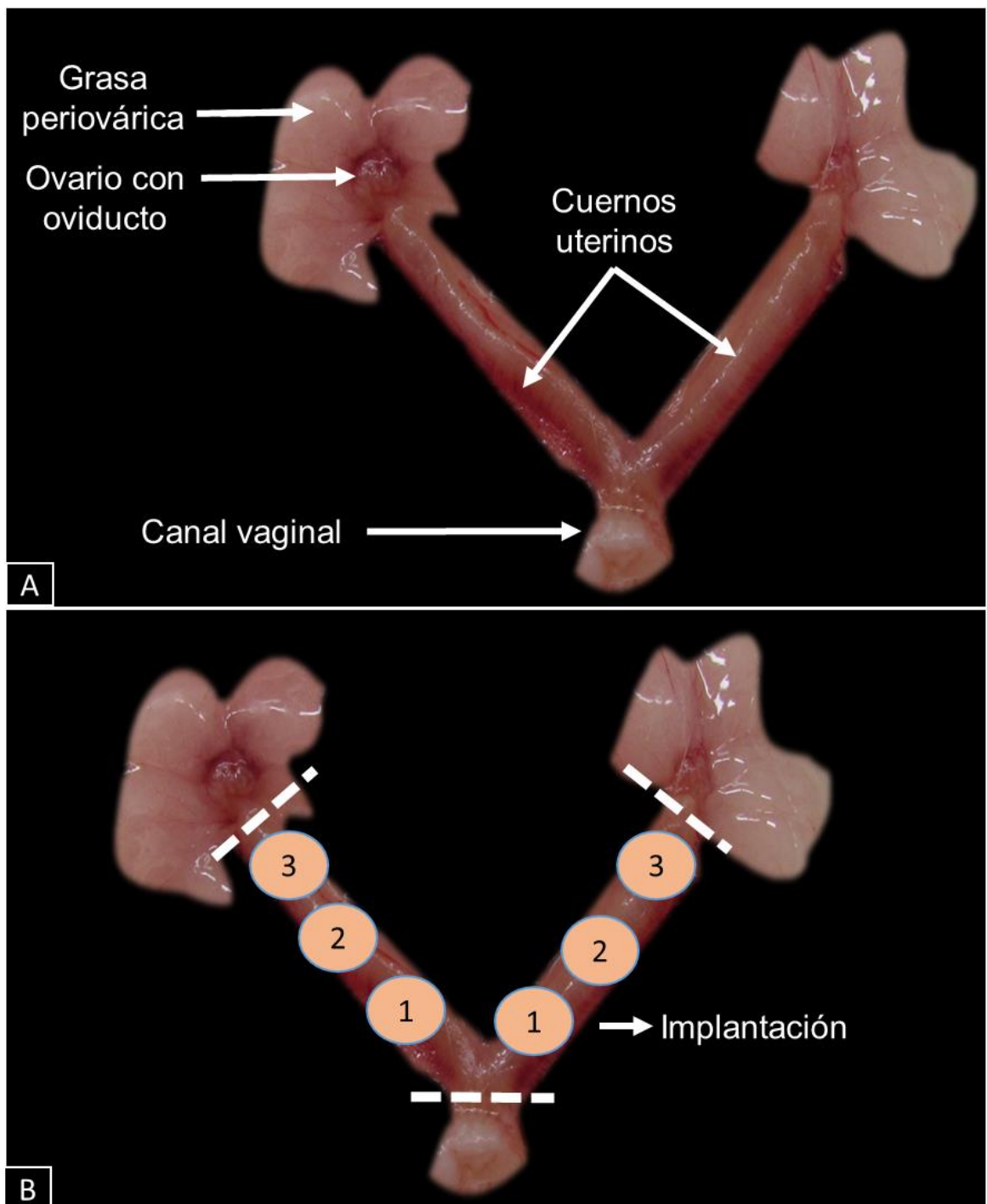


Figura 5: A. Órganos reproductores femeninos. B. Enumeración de los sitios de implantación y sitios de corte para extracción del útero y ovarios.

Obtención de unidad feto –placenta

La disección de estos sitios de implantación requiere de un estereomicroscopio, cajas Petri, buffer fosfato salino frio, pinzas de relojero de punta fina N°5 y tijeras de iris para microdissección, el material de disección debe estar limpio, afilado y sin imperfecciones en las puntas (Fig. 6).



Figura 6: Elementos usados en microdissección. A. El material de microdissección consta de tijeras de microdissección y pinzas lisas de punta fina n°5, también se requiere de cajas Petri de vidrio pequeñas y medianas. B. La disección se hace bajo el estereomicroscopio (MEIJI TECHNO), que consta de iluminación y cámara acoplada para la captura de imágenes.

El útero se retira de la cavidad abdominal y se coloca en una caja Petri, se separa cada sitio de implantación mediante cortes transversales en la región interimplantación usando las tijeras (Fig 7A). Cada implantación se coloca en una caja Petri de vidrio pequeña con buffer fosfato y se lleva a cabo la microdissección con ayuda del estereomicroscopio. El proceso de microdissección consta de cuatro pasos generales: 1) Se retira los restos de útero, con ayuda de las pinzas de disección de punta fina 2) se realizar un corte en las membranas fetales para que fluya el líquido amniótico, 3) se retiran todas las membranas fetales y se observa el feto unido a la placenta mediante el cordón umbilical 4) Separar el feto de la placenta realizando un corte transversal en el cordón umbilical (Fig 7B y 7C).

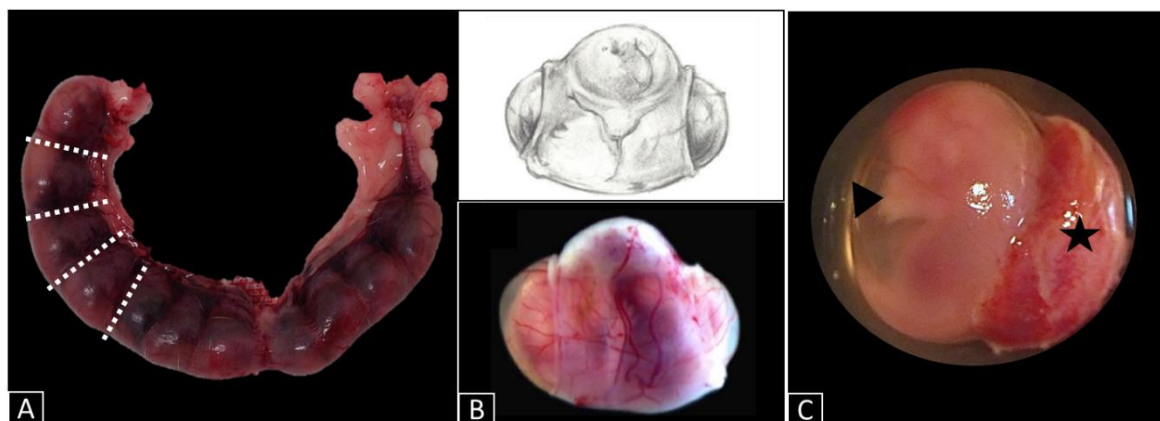


Figura 7: A. Útero de rata con 16.5 dg. Las líneas punteadas muestran el sitio de corte entre los sitios de implantación B. Unidad feto-placenta de 16.5 dg envuelto por útero. C. Feto envuelto en sus membranas (punta de flecha negra) y unido a la placenta (estrella negra). Imágenes 7B, modificadas a partir de, Croy A, et al. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* [Internet]. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Amsterdam: Elsevier; 2014.

Codificación de las muestras

El código de rotulación de las placentas, para el presente estudio se compone por el código del biomodelo madre, la fase del proyecto (FI o FII), la “P” de placenta, la posición de la placenta en el útero (número) y la lateralidad, para derecho “D” e izquierdo “I” (Tabla 1).

Tabla 14. Codificación de las placentas

Código de la madre	Fase	Ubicación en el útero
RWC #	FI (uno)	P# I (izquierda)
RWO #	FII (dos)	P# D (derecha)

Ejemplo: Placenta número cuatro del cuerno derecho de la rata Wistar grupo control número 11 perteneciente a la fase uno.

RWC11FIP4D

Las placentas y fetos son fijados por inmersión en PLP durante dos horas, posteriormente se pasan a alcohol al 70%, y se almacenan a 4°C.

D. Desinfección y eliminación de residuos

- Residuos de PLP: Estos residuos deben descartarse en los recipientes asignados debidamente marcados como desechos de PLP. Se debe registrar en el libro de registro de desechos el volumen de descarte, fecha y responsable.
- Restos del biomodelo: Deber depositar en bolsa roja debidamente rotulada y almacenada en nevera a -20 ° C para ser retirados por ruta hospitalaria.
- Material usado: Se debe desinfectar con hipoclorito de sodio y posterior lavado con jabón neutro.
- Dejar secar y guardar sitio respectivo.
- Los elementos de protección usados: Se descartan en bolsa roja.

Nota: El sitio de trabajo debe quedar limpio y ordenado.

Referencias

Cross JC, Mickelson L. Nutritional influences on implantation and placental development. Nutr Rev. 2006;64:S12–8

Croy A, et al. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy [Internet]. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy. Amsterdam: Elsevier; 2014. 125. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123944450000114>.

Montero, Claudio. 1997. *Manual de Técnica Histoquímica Básica*. Mexico: Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Medicina, Departamento de Anatomía Patológica.

Treuting P; Dintzis S. Comparative anatomy and histology. Oxford: Academic; 2012

ANEXO 2: Protocolo para el análisis macroscópico de la placenta de rata Wistar

Introducción

La placenta es un órgano de interés debido a su importancia en el desarrollo intrauterino del feto. El estudio de este órgano permite conocer las condiciones intrauterinas que experimenta el feto, lo cual es útil al indagar las posibles causas de los efectos adversos que este pueda presentar; ya que a través de la placenta se relaciona la circulación materna y fetal, mediante el intercambio de sustancias nutricionales, productos de desecho y metabolitos. El estudio de la placenta, incluye la determinación de parámetros morfométricos, como son, el peso, el volumen, el diámetro y grosor. El peso es una medida para caracterizar la placenta y representa la suma de otras dimensiones relacionadas con el crecimiento, como el área de superficie y el grosor; el área de superficie placentaria da información sobre el crecimiento lateral y expansivo del disco coriónico, esta dimensión tiene en cuenta el diámetro del disco coriónico. El grosor da información sobre la arborización de la superficie de intercambio nutritivo, haciendo referencia a las vellosidades y la vascularización. Estas dimensiones macroscópicas placentarias, se han relacionado con la función del órgano, por ejemplo el aumento de la superficie placentaria a espesas del aumento del diámetro menor se ha considerado como un mecanismo fetal de compensación asociado a la malnutrición.

Objetivo

Obtener las medidas macroscópicas placentarias de un biomodelo murino durante gestación tardía

Muestra

Placentas de 16.5 días de gestación de rata Wistar

Elementos de protección

- | | | |
|---------|----------|------------|
| 1. Bata | 2. Gafas | 3. Guantes |
|---------|----------|------------|

Reactivos

1. Buffer fosfato salino (PBS)
2. Hipoclorito de sodio al 0.5 %

Materiales

1. Gotero
2. Toallas absorbentes
3. Pinza sin garra mediana

4. Papel craft

Equipos

1. Calibrador digital (precisión 0,01 mm)
2. Balanza digital calibrada (precisión 0,01 g)

Procedimiento

A. Preparación de reactivos

Buffer Fosfato (PBS)

Solución A	Solución B
27,6 g fosfato monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) / 1000 ml agua destilada	Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) se disuelven 28.4 g / 1000 mL de agua destilada
130 mL solución A 0.2 M + 870 solución 0.2 M mL B = 1000 mL de Buffer fosfato 0.2 M pH 7.6	
1000 mL de PB 0.2 M pH 7.6 + 1000 mL de agua destilada = 2000 mL de PB 0.1 M pH 7.6	
Buffer fosfato salino (PBS): Por cada 1000 mL de PB agregar 8.9g de NaCl Verificar que el pH sea aprox. 7.34	

Nota: Conservar a 4-8 °. Es estable por tres o más meses. Desechar si aparecen cambios de coloración o precipitados.

Hipoclorito de sodio 0.5%

Reactivo	Para 100 mL
Hipoclorito al 5.25%	9.5 mL
Agua destilada	101

B. Preparación del lugar de trabajo

El sitio de trabajo debe ser desinfectado con hipoclorito al 0.5%.

C. Técnica

1. El peso de cada placenta, se realiza usando una balanza digital con precisión de 0,01 g (Fig. 1).



Figura 1: Pesaje de placentas en balanza digital.

2. Las medidas de superficie placentaria se determina el área de una elipse. Diámetro menor x diámetro mayor x $\pi/4$ ($=\pi r^2$), dónde el diámetro mayor y menor se miden colocando las pinzas del calibrador digital, precisión 0.01 mm en los bordes de la placenta, los dos ejes de medida deben cortarse perpendicularmente en el centro de la placenta (Fig. 2).

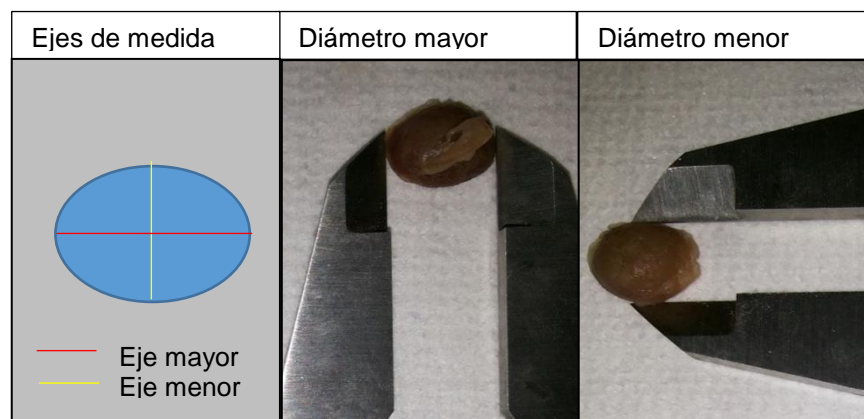


Figura 2: Demostración de la forma de medir el diámetro mayor y menor de la placenta murina. Imágenes propias.

3. El grosor placentario se debe medir tomando como referencia el sitio de inserción del cordón umbilical, usando un calibrador digital de precisión 0.01mm (Fig.3).



Figura 3. Medición del grosor de una placenta de rata. Imagen propia.

4. Se calcula el volumen placentario usando la siguiente formula: $\pi r^2 \times \text{grosor}$

Nota: Las muestras deben estar constantemente humedecidas con buffer fosfato, durante las determinaciones.

Los datos se consignan en un formato de acuerdo a la codificación establecida en el anexo 1.

D. Desinfección y eliminación de residuos

- Material usado debe ser desinfectado con hipoclorito de sodio 0.5%, luego debe ser lavado con jabón neutro, se debe dejar secar y luego organizar en su sitio respectivo.
- Los elementos de protección usados: Se deben descartar en bolsa roja.

Nota: El sitio de trabajo debe quedar limpio y ordenado.

Referencias

Anjankar VP, Parchand MP, Anjankar AP, Kamdi NY, Meshram MM. Placental Morphometry in Toxaemia of Pregnancy. Sch. J. App. Med. Sci., 2014; 2(1B):205-208

Balihallimath, Rupa L. et al. 2013. "Placental Morphometry Determines the Birth Weight." Journal of Clinical and Diagnostic Research 7(11): 2428–31.

Cardoso, Viviane et al. 2012. "Medidas Del Crecimiento Placentario Y Su Relación Con El Peso de Nacimiento Y La Edad Gestacional. Revisión Bibliográfica." Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá 31(2): 69–74. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91224139006>.

Montero, Claudio. 1997. Manual de Técnica Histoquímica Básica. México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Medicina, Departamento de Anatomía Patológica.

ANEXO 3: Protocolo procesamiento histoquímico de la placenta de rata Wistar

Introducción

La observación de estructuras histológicas y celulares a través del microscopio de luz es posible en muestras delgadas y teñidas. Las muestras delgadas permiten el paso de haces de luz y la tinción facilita demostración de estructuras de interés. Para la obtención de secciones delgadas, la muestra deberá someterse a un proceso de fijación, deshidratación, aclaramiento e inclusión en parafina, que permitirá obtener una muestra lo suficientemente dura para la realización de cortes muy delgados. Existen instrumentos como el micrótopo de rotación, que permiten obtener secciones del orden de micras y es el más usado para las técnicas histológicas de rutina. Para la ulterior observación en microscopio de luz, las secciones deberán someterse a procesos de tinción, debido a que la mayoría de los tejidos de origen animal son incoloros.

La coloración con hematoxilina-eosina es una de las técnicas más empleadas y ampliamente aceptadas para el estudio de tejidos y células. Esta tinción diferencial brinda propiedades de coloración específica a núcleos y citoplasmas celulares. Los núcleos se tiñen mediante hematoxilina, se pueden observar color azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro. El citoplasma y material extracelular se tiñe con eosina, dando como resultado diferentes tramas de rosado.

Objetivo

Obtener cortes delgados de placenta a nivel de micras listos para tinción y marcaje

Muestra

Placentas de 16.5 días de gestación de rata Wistar fijadas en PLP y postfijadas en alcohol al 70%

Elementos de protección

- | | | |
|---------|----------|------------|
| 1. Bata | 2. Gafas | 3. Guantes |
|---------|----------|------------|

Materiales

1. Pinzas lisas
2. Toallas absorbentes
3. Casetes de inclusión
4. Moldes metálicos
5. Lápiz
6. Cuchillas minora
7. Pinceles
8. Cuchillas para micrótopo
9. Portaobjetos

10. Portaobjetos cargados
11. Canastillas metálicas
12. Lápiz punta diamante
13. Cubreobjetos
14. Papel filtro

Equipos

1. Cámara extractora (FEX 120)
2. Procesador de tejidos (Leica TP 1020)
3. Estación de inclusión (Histocentre 3)
4. Plancha (Thermolyne)
5. Agitador y magneto (Fisher Cientific)
6. Micrótopo de rotación Leica RM 2255
7. Baño de flotación (Boekel Scientific)
8. Horno (Thelco)

Reactivos

1. Alcohol de 70%
2. Alcohol 80%
3. Alcohol de 95%
4. Alcohol 100%
5. Xilol
6. Parafina (Histoplast PE)
7. Agua destilada
8. Gelatina (Gelatin from porcine skin Type A) Sigma-Aldrich
9. Hielo
10. Bateria de tinción de hematoxilina-eosina
11. Consul Mount
12. Hipoclorito de sodio 0.5%
13. Detergente

Procedimiento

A. Preparación del lugar de trabajo

Antes de iniciar el procedimiento se debe:

- Realizar limpieza del sitio de trabajo
Alistar previamente el material que se va a utilizar
- Iniciar el procesador de tejidos una hora antes de iniciar el procesamiento de la muestra, para que la parafina esté totalmente líquida.
- Rotular los casetes de inclusión con el código de la placenta y se adicionará el ítem “mitad” (Tabla 1).

Tabla 115. Codificación de bloques

Código de la madre	Fase	Ubicación en el útero	Mitad
RWC #	FI (uno)	P# I (izquierda)	a
RWO #	FII (dos)	P# D (derecha)	b

Ejemplo: Mitad “a” de la placenta RWC11P4D.

RWC11FIP4Da

B. Técnica

Selección de la muestra

Las placentas almacenadas en alcohol al 70% se dividen en dos partes iguales utilizando una cuchilla minora, el corte se debe realizar siguiendo el eje mayor placentario, a través de la inserción de cordón umbilical (Fig.1). Las mitades se colocan en casetes rotulados utilizando una pinza lisa mediana. Los casetes se depositan en el primer recipiente del procesador de tejidos, correspondiente a alcohol al 70%.



Figura 1: División de la placenta a través del eje mayor. Modificado de Furukawa et al., 2014.

Deshidratación, aclaramiento e infiltración

Las muestras se llevan al procesador de tejidos, equipo que permite la deshidratación y la parafinización de las muestras, consta de 12 vasos (Fig. 2). Se tomó como base el protocolo descrito por Croy A, et al. 2014, con modificaciones (tabla 2).

Tabla 2. Protocolo a programar en el procesador de muestras.

Reactivos	Reactivos	Número de vasos	Tiempo por vaso
Deshidratación	Alcohol 70%	1	45 minutos
	Alcohol 80%	1	45 minutos
	Alcohol 95%	2	45 minutos
	Alcohol 100%	4	45 minutos
Aclaramiento	Xilol	2	45 minutos
Infiltración	Parafina	2	1 hora
Total	9 horas y 30 minutos		



Figura 2: Procesador de tejidos Leica TP 1020

Inclusión en parafina

Los casetes se retiran del procesador de tejidos (Fig. 3) y se trasladan a la estación de inclusión (temperatura 60 °C).



Figura 3: Estación de inclusión- Histocentre 3.

1. Los casetes se depositan en un zona caliente dentro de la estación junto con los moldes metálicos

2. Se verifica que la llave reguladora de parafina esté abierta lo suficiente y se procede a llenar los moldes metálicos de parafina líquida
3. Se ubica la muestra en el molde metálico sobre el eje de división (Fig. 4)



Figura 4: Ubicación de la muestra en el molde metálico.

4. Se desplaza el molde hacia la zona fría haciendo presión negativa sobre la muestra; se debe sostener el molde en la zona fría hasta que el fondo se solidifique
5. Rápidamente se coloca la base del casete sobre el molde metálico (la tapa se descarta) y se agrega más parafina líquida; sin dejar rebosar.
6. Luego se pasa a la placa fría para que la parafina termine de solidificar.
7. Después de que la parafina esté solidificada, se retira el molde metálico y la muestra queda lista para el proceso de corte.

Corte en micrótopo

El lugar en el que se realiza el procedimiento debe estar limpio, poseer buena iluminación y en él estar dispuestos los materiales que se necesitan para todo el procedimiento, tales como:

- Cuchillas para desbastar
- Cuchillas para el micrótopo
- Pinceles
- Portaobjetos
- Baño de flotación, la temperatura de trabajo será de 40°C.

Nota: Para cortes que se someten a técnica histoquímica, se debe agregar gelatina al baño y se espera hasta que se solubilice (2 g de gelatina en agua destilada). Los cortes para inmunohistoquímica se deben recoger en portaobjetos cargados y el baño no necesita contener gelatina (para eliminar los restos de gelatina del baño maría es necesario lavarlo previamente con agua caliente).

Se debe llevar a cabo una serie de procesos sobre el bloque de parafina antes de hacer el primer corte útil de la muestra.

1. Se debe considerar cuál de las caras es la que primero se ponga en contacto con la cuchilla. Esta cara debe ser más ancha que la opuesta, y ambas han de ser paralelas; para lo cual se debe retallar el bloque hasta hacer una pirámide truncada.
2. Los bloques retallados se colocan en una cubeta de hielo
3. Preparación del micrótomomo para el corte (Fig. 5 y 6)
 - La cuchilla se saca del su contendor y se limpia con alcohol para eliminar la sustancia grasosa de su superficie
 - La cuchillada debe de estar orientada en un ángulo de uno 3° respecto a la superficie de corte
 - El grosor de corte se debe ajustar a cuatro micras
 - La muestra se coloca en el porta muestras, y luego se lleva éste soporte hacia atrás
 - La muestra se manipula por medio de la manivela del micrótomomo



Figura 5: Micrótomomo de rotación RM 2255 y baño de flotación

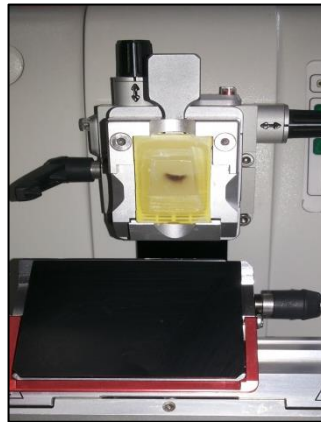


Figura 6: Ubicación del bloque en el micrótomomo

4. Se debe llevar a cabo un proceso de desgaste para llegar a la muestra
5. Una vez comenzado el corte de la muestra se obtienen tiras de secciones unidas por las caras paralelas a la cuchilla. Estas tiras se manipulan con pinceles y, antes de su fijación definitiva en la superficie de un portaobjetos, se deben estirar para que el tejido quede perfectamente extendido (Fig.7).
6. Los cortes se depositan en un tanque de flotación con 35 °C a 40 °C de temperatura, el calor permite la extensión de los cortes (Fig. 7).

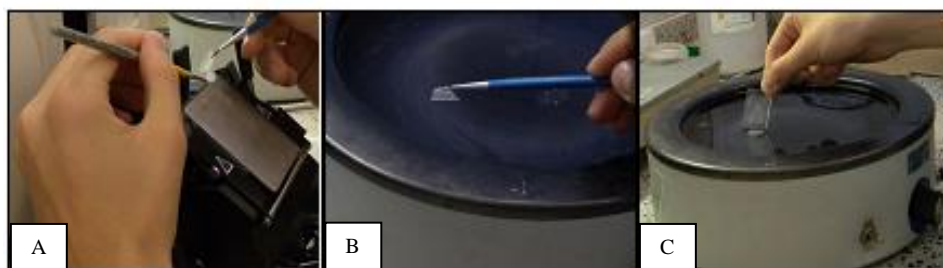


Figura 7: Proceso para la obtención de cortes parafinados

7. Se recogen tres cortes seriados de cuatro micras por placa (fig. 8 y 9).

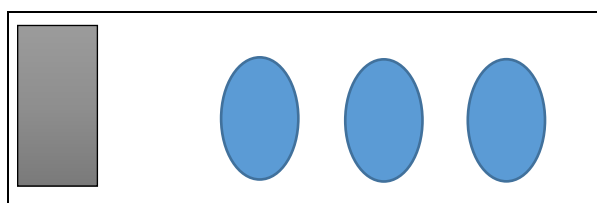


Figura 8: Forma de colocar los cortes para histoquímica

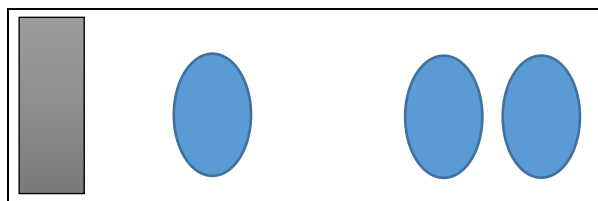


Figura 9: Forma de colocar los cortes para inmunohistoquímica

Nota: antes de extender la muestra en el portaobjetos, éste debe estar debidamente marcado con un código específico usando un lápiz de punta diamante.

8. Los cortes en portaobjetos se deben llevar al horno de secado a una temperatura entre 35 °C y 40 °C durante toda la noche (Fig. 10).
9. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones están listos para el procesamiento posterior.



Figura 10: Secado de las placas en horno a 37°C

Al finalizar el trabajo se debe dejar todo limpio y ordenado; llenar los formatos correspondientes a los equipos utilizados.

Codificación

La codificación de las placas debe ser igual a la del bloque origen y se le adiciona el tipo de tinción (hematoxilina-eosina=HE, Inmunohistoquímica=IH) y el número de la placa (Tabla 3).

Tabla 3. Codificación de placas

Código de la madre	Fase	Ubicación en el útero	Mitad	Tinción	Número de la placa
RWC #	FI (uno)	P# I (izquierda)	a	H-E	#
RWO #	FII (dos)	P# D (derecha)	b	IH	

Ejemplo: Placa número tres del bloque RWC11FIP4Da con tinción de hematoxilina-eosina

RWC11FIP4Da-HE-03

Tinción

Se debe preparar la cabina extractora para trabajar con la batería de tinción (Fig. 11).



Figura 11: Batería de tinción de Hematoxilina-eosina

Coloración de hematoxilina-eosina

Para realizar la coloración de hematoxilina- eosina se deben seguir los siguientes pasos

1. Desparafinar

Reactivo	Pases	Tiempo (minutos por pase)
Xilol	2	3

2. Hidratar

Con alcohol etílico o isopropílico. Se realizan sucesivos lavados en alcohol en concentraciones decrecientes:

Reactivo	Pases	Tiempo (minutos por pase)
Alcohol 100%	2	3
Alcohol 95%	2	3
Alcohol 70%	1	3

Se elimina el alcohol sobrante de las muestras con una servilleta de papel y se dejan en un recipiente con agua corriente por 3 minutos para permitir la hidratación de la muestra.

3. Coloración con solución de hematoxilina

Para las muestras de placenta de murino se dejan de cinco (5) a siete (7) minutos.

4. Se hace un lavado en agua corriente por tres (3) minutos

5. Se elimina el exceso de colorante, usando alcohol ácido, realizar un lavado de tres (3) segundos

6. Se lava en agua corriente por tres (3) minutos

7. Se emplea solución de carbonato de litio al 1% durante 30 segundos

8. Se lava con agua corriente durante tres (3) minutos

9. Se colorea con solución alcohólica o acuosa de eosina por dos (2) minutos

10. Se deshidrata en baños crecientes de alcohol

Reactivo	Pases	Tiempo por pase
Alcohol 95%	1	3 segundos
Alcohol 100%	1	3 segundos
Alcohol 100%	3	3 minutos

11. Se aclara el tejido empleando xilol

Reactivo	Pases	Tiempo (minutos por pase)
Xilol	3	3

En estas condiciones las muestras están preparadas para realizar el montaje

12. Montaje

Al terminar el proceso de coloración se procede a montar las placas usando una gota de Consul Mount (soluble en xilol) en un cubreobjeto, este se coloca sobre la muestra ubicada en el portaobjeto cuidando evitar la formación de burbujas.

C. Desinfección y eliminación de residuos

El material usado se debe desinfectar con hipoclorito de sodio al 0.5% y lavarse con jabón neutro. Se deja secar y se organiza en su sitio respectivo.

El recipiente metálico del procesador de tejidos y los moldes metálicos se deben lavar con agua y jabón caliente para que se pueda retirar la parafina.

Los elementos de protección usados se deben descartar en bolsa roja.

Nota: El sitio de trabajo deberá quedar limpio y ordenado.

Referencias

Cediel J. F., Cárdenas M. H., García A., Chuaire L., Payan C., Villegas V., Sánchez C. 2009. Manual de Histología. Tejidos Fundamentales. Facultad de Medicina. Editorial Universidad del Rosario. Bogotá. 366 pp.

Croy A, et al. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy [Internet]. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy. Amsterdam: Elsevier; 2014. 125. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123944450000114>.

Escarabajal M. D., Vargas J. P., López J. C., Portabella M., Carrasco M. 2006. Fundamentos de Psicobiología. Libro de práctica I. Primera Edición. Delta Publicaciones. España. 101 pp.

Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. Journal of Toxicologic Pathology. 2014;27(1):11-18.

García del Moral, R. 1993. Laboratorio de anatomía patológica, editorial interamericana MacGraw-Hill.

García M., Belso E., Salas-Roda M., Gómez D., Arteaga D., García L., Castilla M., Ruiberriz A., Ania J., Ochoa O., Caras J., Puertas E., Vilches A. 2006. Técnico Especialista en Anatomía Patológica del Servicio Gallego de Salud. Editorial MAD. España. 341 pp.

Molist, P. Pombal, M. & Megias, M. 2011. Atlas de histología vegetal y animal, técnicas histológicas: Capítulo 3. Universidad de Vigo. Pág. 5-21. Disponible: <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>

Montero, Claudio. 1997. Manual de Técnica Histoquímica Básica. México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Medicina, Departamento de Anatomía Patológica.

ANEXO 4: Protocolo para la captura y reconstrucción de imágenes placentarias - uso del programa lasv4.7 y la aplicación Image Builder (LIB)

Introducción

Las muestras coloreadas pueden ser observadas y evaluadas al microscopio de luz, sin embargo hoy en día existen herramientas que permiten adquirir la imagen digital completa, mediante la reconstrucción de una imagen panorámica. Para la captura de las imágenes se deben ajustar los parámetros de las aplicaciones usadas de acuerdo a las características de tinción y grosor que tenga la muestra, que permitan obtener una imagen unificada de alta calidad.

Objetivo

Obtener imágenes digitales de las muestras de placenta para su posterior análisis

Muestra

Placas de placentas de 16.5 días de gestación de rata Wistar procesadas para técnica histoquímica y coloreadas con hematoxilina-eosina

Elementos de protección

1. Bata
2. Guantes

Materiales

1. Xilol
2. Alcohol isopropílico
3. Toallas absorbentes
4. Copitos de algodón
5. Reglilla de calibración (Olympus) 1/100= 0.01mm

Equipos

1. Microscopio Leica DM750 con cámara acoplada DFC 295

Software

1. Aplicación LASV4.7
 - Herramienta Image Builder (LIB)

Procedimiento

A. Preparación del sitio de trabajo

Antes de iniciar la captura de las imágenes, se deben escoger las placas, seleccionar los cortes, limpiar las superficies de las placas con xilol y toallas absorbentes. Se debe verificar que el microscopio de luz se encuentre limpio, de lo contrario, limpiar objetivos usando alcohol isopropílico y copitos de algodón.

B. Pasos para la captura y reconstrucción

1. Iniciar el computador
2. Encender el microscopio
3. Colocar la placa sobre la platina del microscopio
4. Abrir por completo el diafragma de campo
5. Abrir el diafragma de apertura (Diafragma del condensador)
6. Enfocar la muestra con objetivo de 4x
7. Regular la intensidad de luz desde la perilla de control de iluminación
8. Iniciar la aplicación LASV 4.7 (Fig. 1)

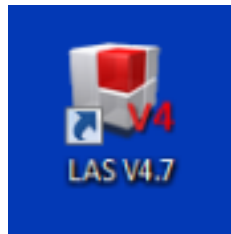


Figura 1: Icono de aplicación

9. El enfoque del microscópico, es diferente al que se proyecta en la aplicación, por lo que se debe enfocar observando a la pantalla del computador, para esto se debe verificar en la pestaña “Mic1”, el objetivo seleccionado, luego ubicarse en la pestaña “adquirir”, seguido de la pestaña “cámara” (Fig. 2 y 3).

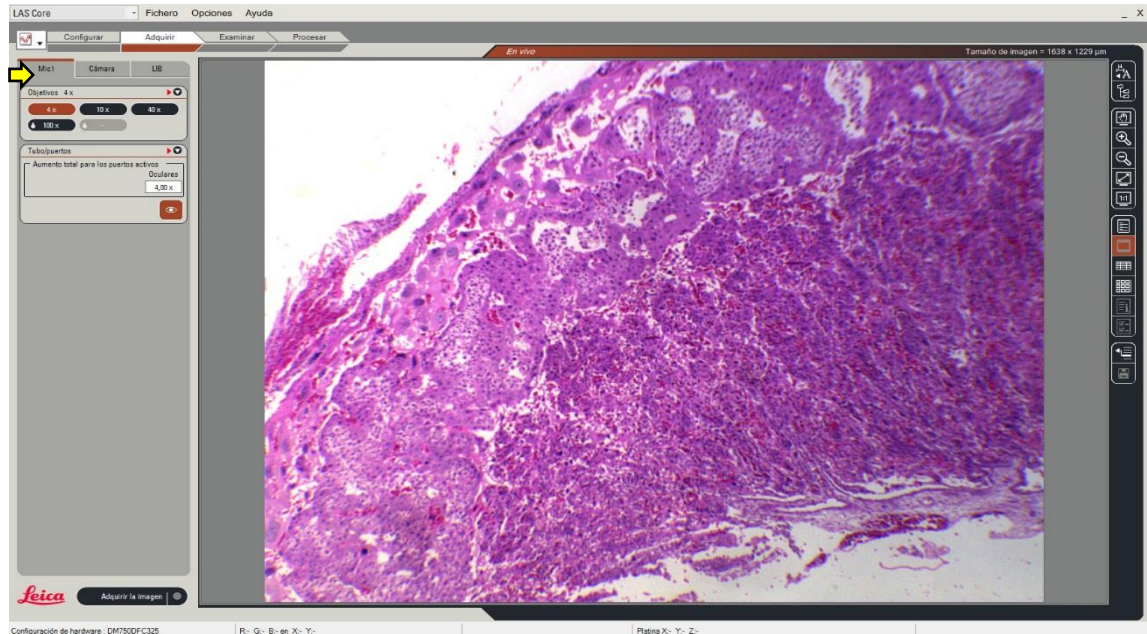


Figura 2: Verificación del objetivo seleccionado en la pestaña “Mic1” de la aplicación Las V4.7 (flecha amarilla).

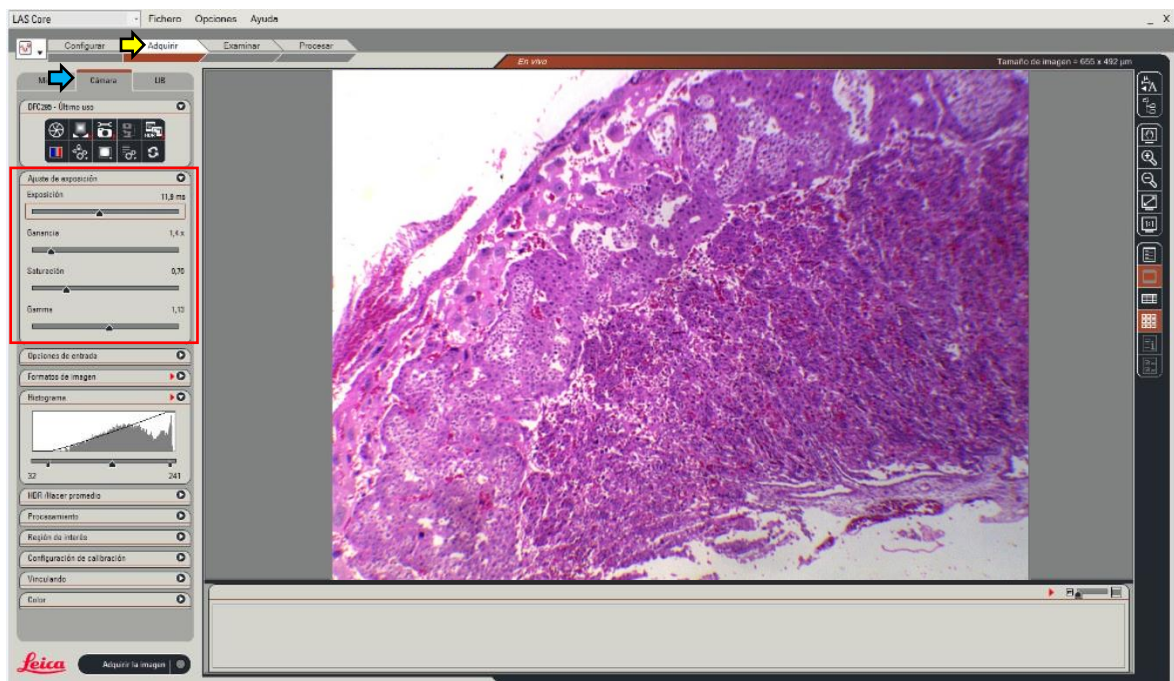


Figura 3: Enfoque de la imagen en la aplicación LASV4.7. Flecha amarilla, pestaña “adquirir”; flecha azul, “cámara.” Recuadro rojo, opciones de ajuste de exposición.

10. Ajustar los parámetros de la captura según el grosor y tinción de la muestra (Fig. 3).

- Exposición 11.9 ms (10.00-20.00ms)
- Ganancia 1.4 x (1.0x-2.5x)
- Saturación 0.7 x (0.5x-0.75)
- Gamma 1.13 (0.70-1.15)

11. Ajustar balance de blancos moviendo la platina hasta donde se observe una parte de la placa sin muestra y dar clic sobre el icono “balance de blancos automático...” (Fig. 4)

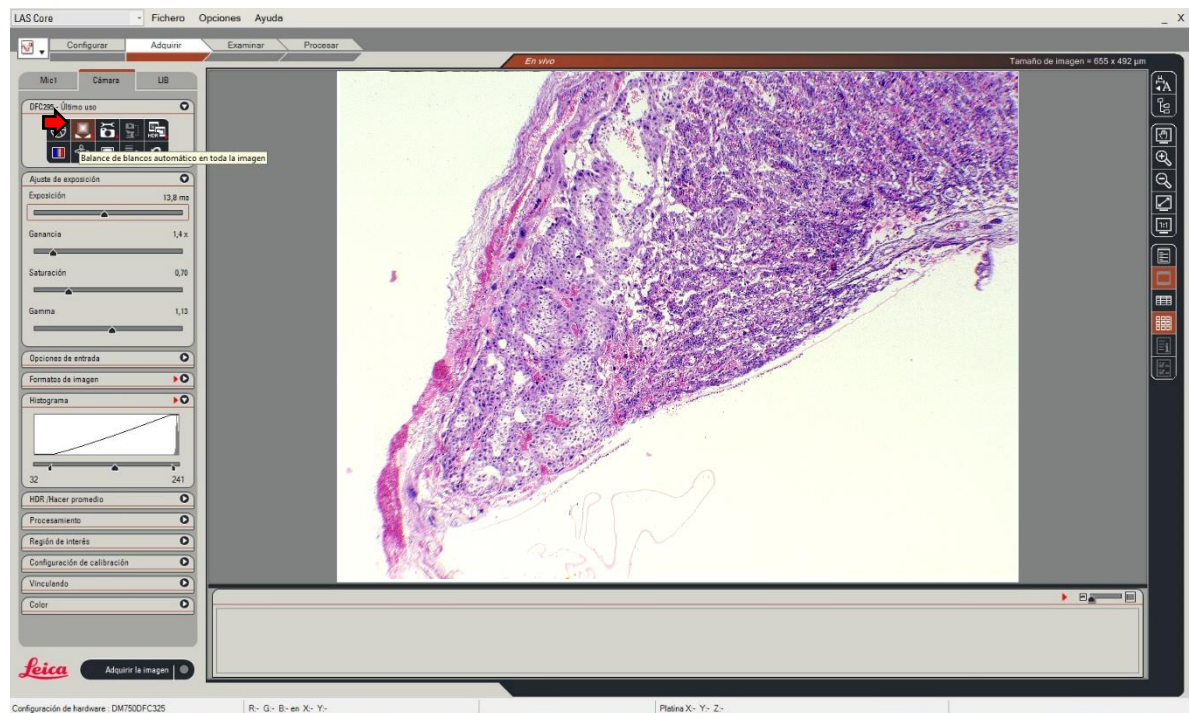


Figura 4: Ajuste de balance de blancos

12. Crear carpeta para el almacenamiento de las imágenes adquiridas. Abrir el navegador de la barra de la derecha, dar clic en el icono “crear un nuevo “New folder”” y seleccionar la ubicación para crear la carpeta (ej. Desktop). Escribir el nombre de la nueva carpeta (ej. Placenta...) y cerrar la ventana del navegador en la “X” (Fig. 5).

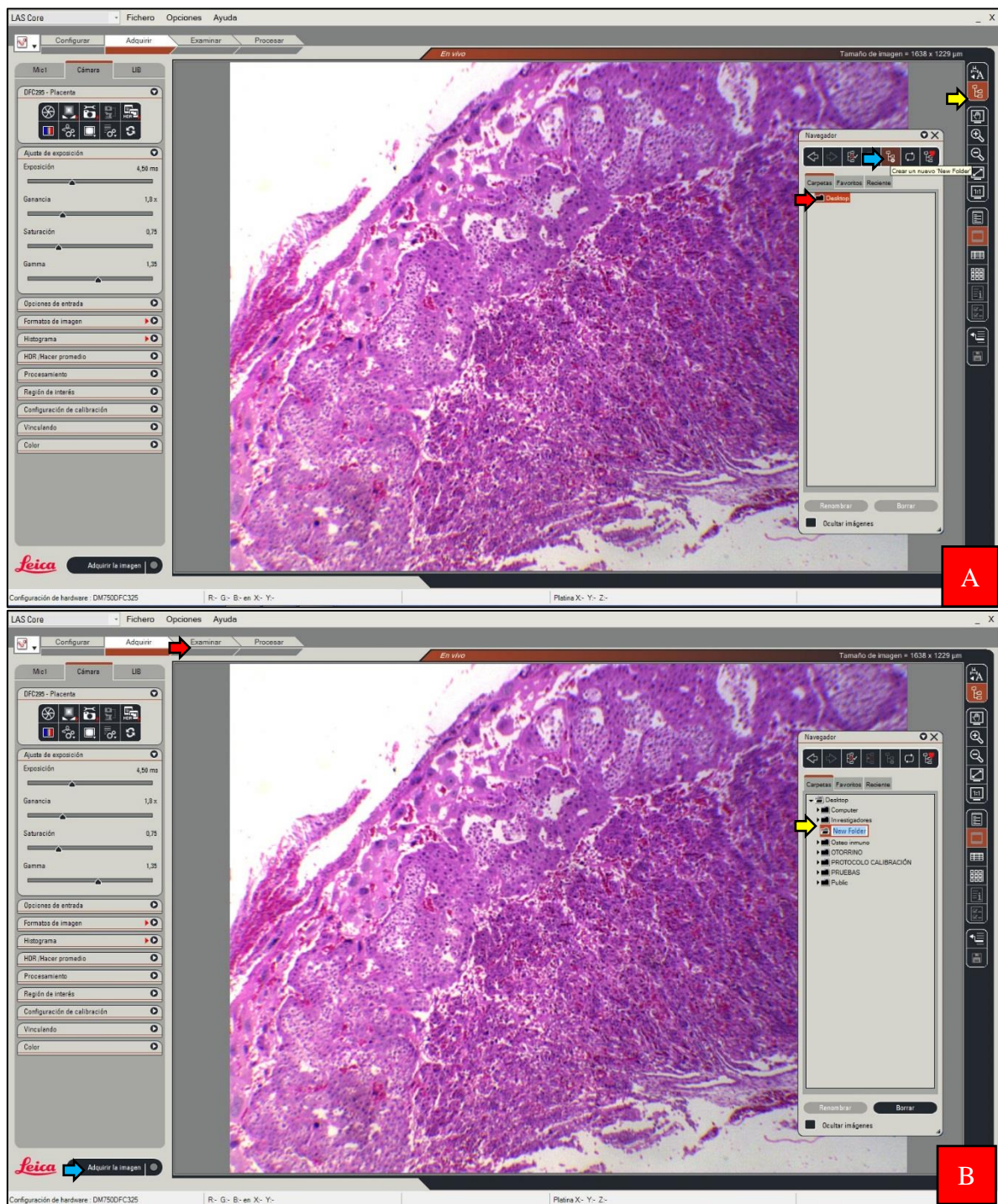


Figura 5: Creación de carpeta para guardar las imágenes capturadas. A. Flecha amarilla, primer paso; flecha azul, segundo paso; flecha roja, tercer paso. B. Flecha amarilla, nombrar carpeta; flecha azul, opción “adquirir imagen; flecha roja, pestaña “examinar.

13. Se puede tomar una foto para probar los parámetros de captura, usando la opción “adquirir imagen”, en la parte inferior izquierda de la aplicación y observar la captura utilizando la pestaña “examinar”, en la parte superior (Fig. 5b).
14. Una vez ajustados los parámetros de captura, seleccionar la pestaña “LIB”, para ir al menú de la herramienta de reconstrucción, luego seleccionar la opción “extender en el eje XY” (Fig. 6).

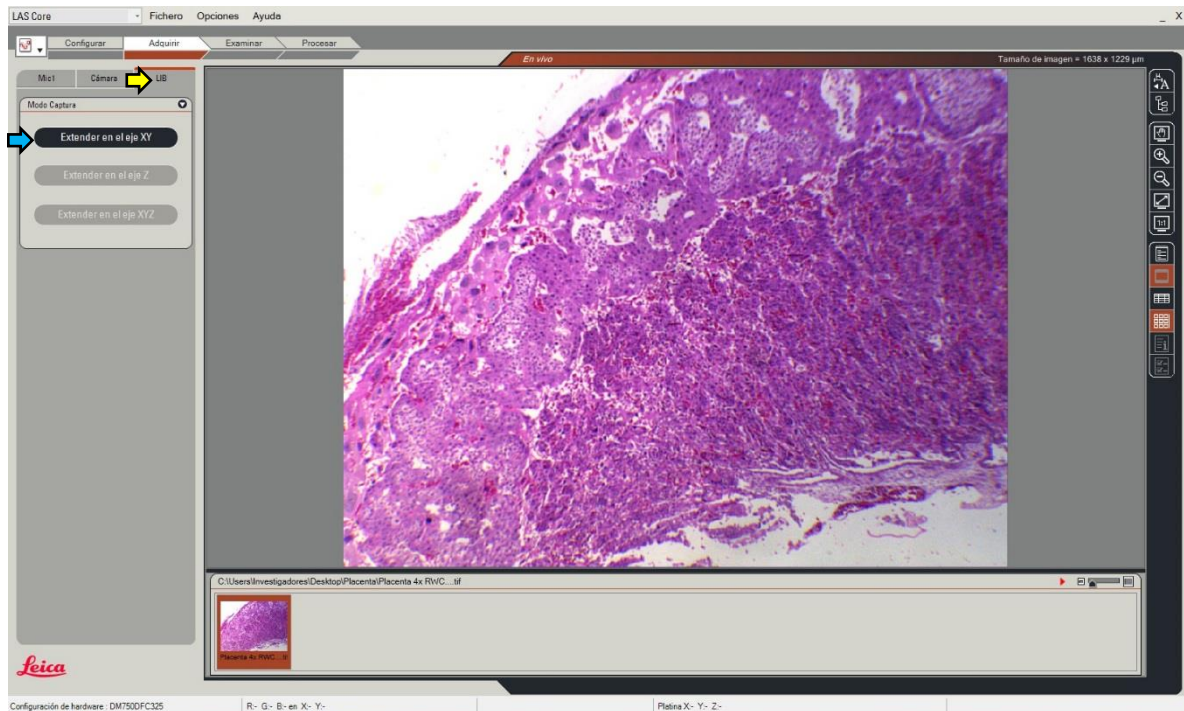




Figura 6: Entrada la herramienta de reconstrucción de imágenes. Flecha amarilla, pestaña “LIB”; flecha azul, opción “extender en el eje XY”.

15. Para iniciar la captura de la imagen dar clic en la opción “comenzar a construir imagen”, de la parte superior de la aplicación. En una ventana adicional se observa la imagen en vivo que permite guiar la captura (Fig. 7).
16. Al iniciar la captura aparece la primera foto demarcada con un recuadro verde y corresponde a la imagen enfocada. Para enfocar la nueva imagen se pausa la captura con el mismo icono que antes decía “comenzar a construir imagen”, el cual mientras se esté capturando pasa de un punto rojo () a un signo de pausa (), (Fig. 8).

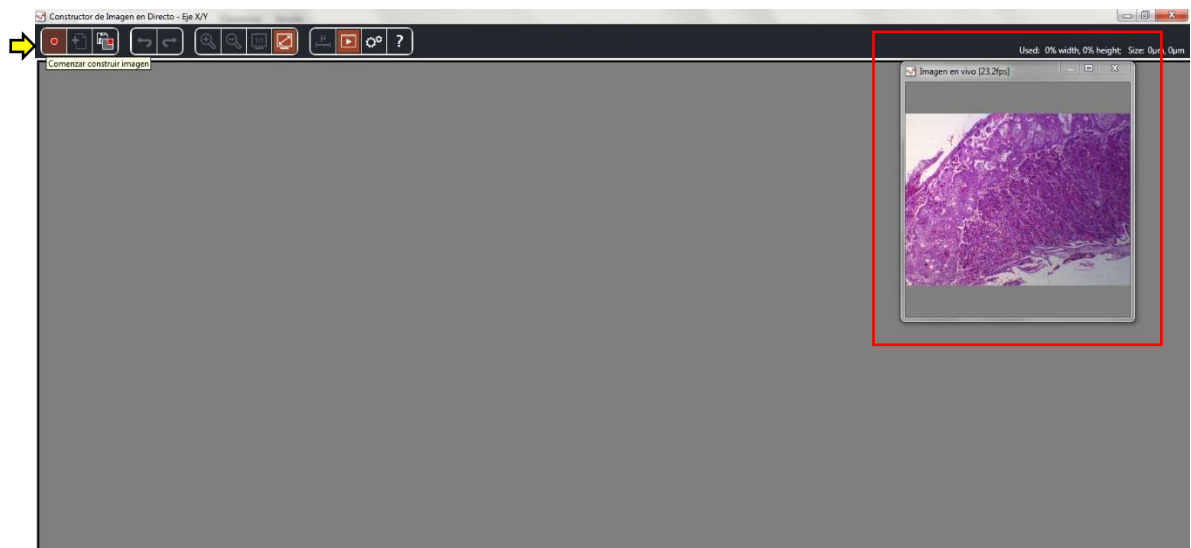


Figura 7: Inicio de la aplicación Image Builder (LIB), flecha amarilla; recuadro rojo, imagen en vivo.

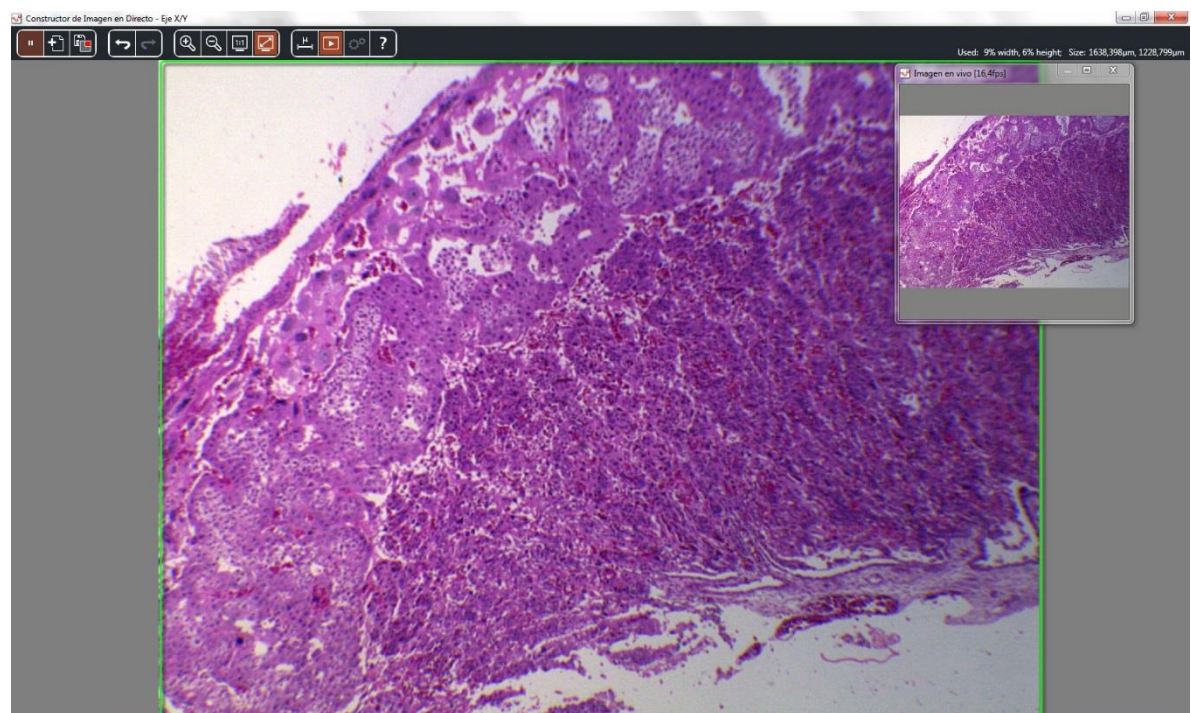


Figura 8: Primera imagen capturada con el LIB.

17. Mientras la captura este en pausa se puede mover la platina del microscopio y observar la nueva ubicación en el recuadro de la derecha que muestra la imagen en vivo. El siguiente sitio de capturar debe tener un recuadro verde, esto indica que la aplicación reconoce la ubicación de la imagen y la puede pegar con la anterior imagen capturada, si se observa un recuadro rojo, se debe mover la platina hasta que llegue al punto de captura correcto (Fig. 9).
18. Luego de ubicar el nuevo sitio de captura, dar clic en la opción “comenzar a construir imagen” y aparece la nueva imagen, se sigue haciendo lo mismo hasta reconstruir la imagen requerida (Fig. 9)

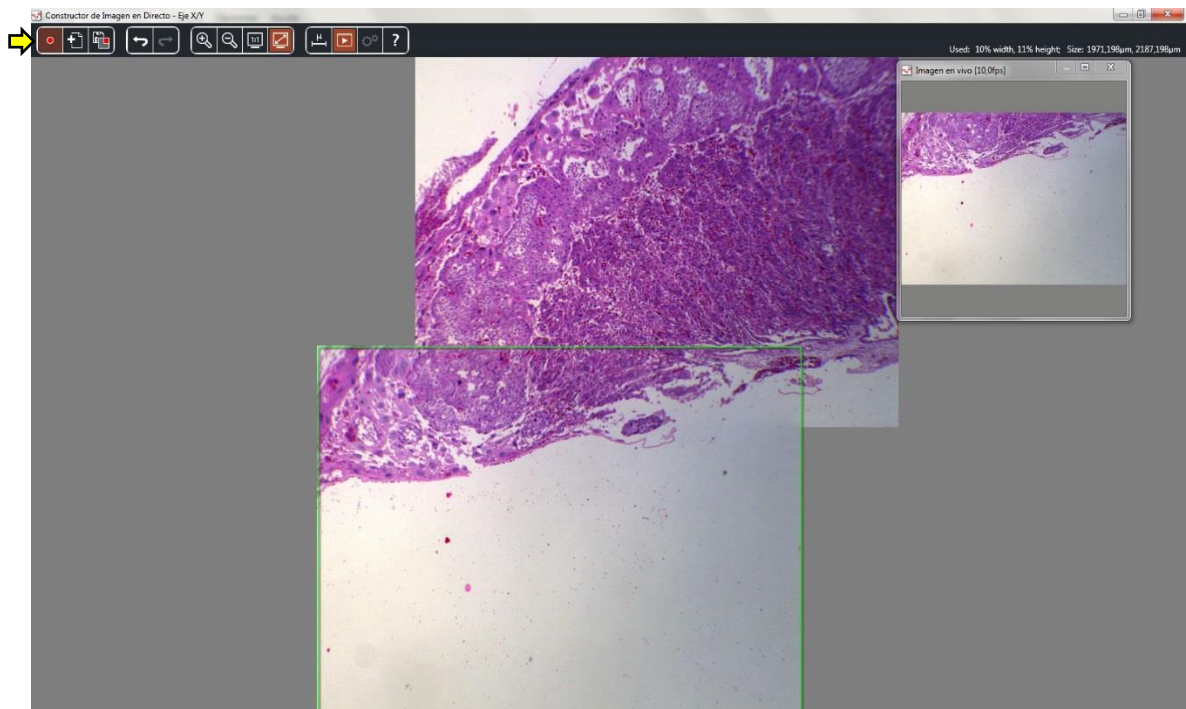


Figura 9: Continuación de la reconstrucción. Flecha amarilla, “comenzar a construir imagen”.

19. Finalizada la reconstrucción, guardar la imagen haciendo clic en la opción “volver a LAS”, ubicado en la parte superior de la aplicación, emerge un cuadro de diálogo y en este, dar clic en la opción “Save” (Fig. 10).
20. Nombrar la nueva imagen reconstruida y seleccionar el formato “TIF”. La imagen queda almacenada en la carpeta creada previamente (Fig. 11).
21. La imagen reconstruida se puede observar en la pestaña “examinar”. Para recortar las imágenes irregulares, ir a la pestaña “procesar”, elegir la opción “realce”, luego “recortar” y dar clic en “iniciar” (Fig. 12).

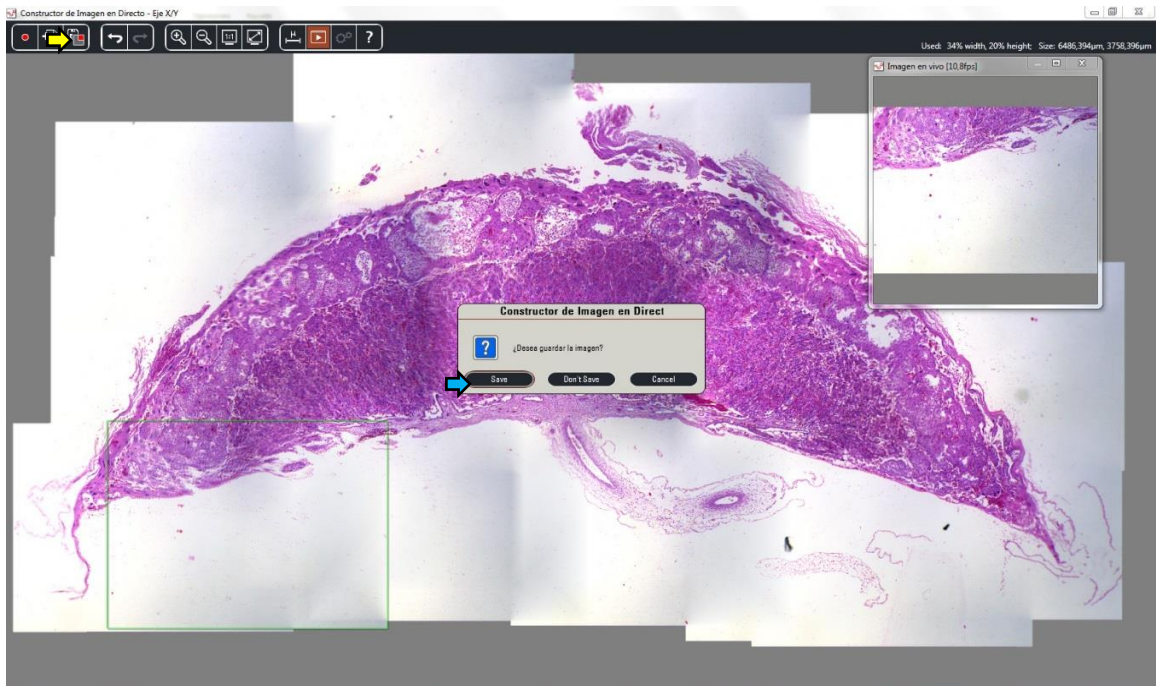


Figura 10: Finalización de la captura y almacenamiento de la imagen. Flecha amarilla, opción “volver a LAS”; flecha azul, opción “save”.

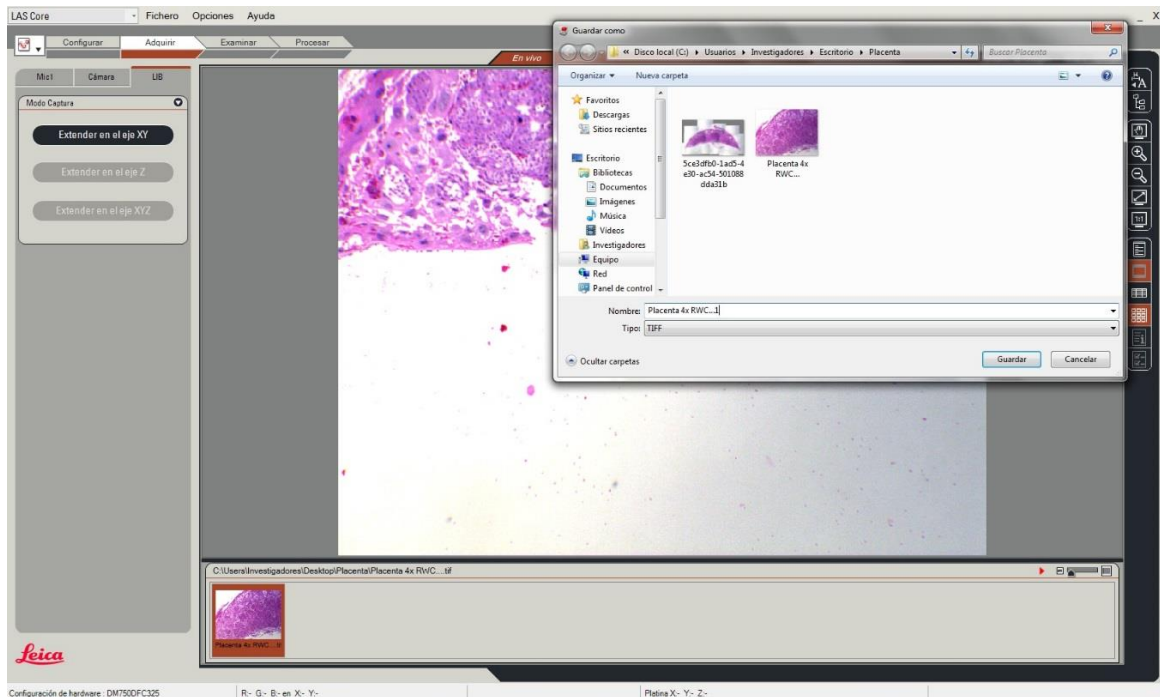


Figura 11: Selección del formato de almacenamiento de la imagen capturada.

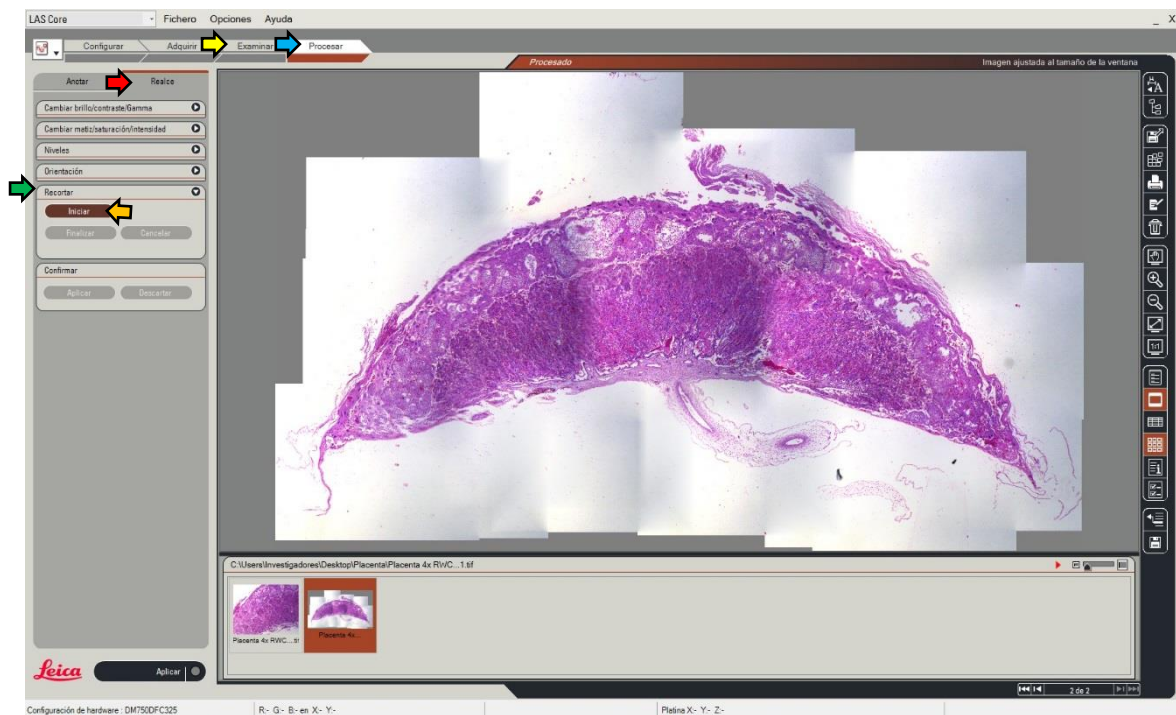


Figura 12: Edición de la imagen reconstruida. Flecha amarilla, opción examinar; flecha azul, opción procesar; flecha roja, pestaña “realce”; flecha verde, opción “recortar”; flecha naranja, opción “iniciar”.

22. Al iniciar el recorte, aparece un recuadro negro de guía, que permite ajustar el límite de corte, una vez ajustado el recuadro, dar clic en la opción “finalizar” (Fig.13).

23. Dar clic en aplicar, en el cuadro de diálogo seleccionar la opción de reemplazar la imagen (Fig. 14).

24. Al terminar la capturar las imágenes, cerrar la aplicación LASV4.7, retirar las imágenes en una USB, no se deben dejar imágenes guardadas en el equipo. Apagar el equipo y el microscopio, este debe quedar en el objetivo de 4x, con la intensidad de luz mínima, diafragma en 4x y tapado. No olvidar llenar el registro de uso.

Nota: El equipo permanece calibrado, en caso de que no lo esté, se debe hacer la calibración de la aplicación, previo a la captura de imágenes. Para calibrar, seguir los pasos a continuación descritos.

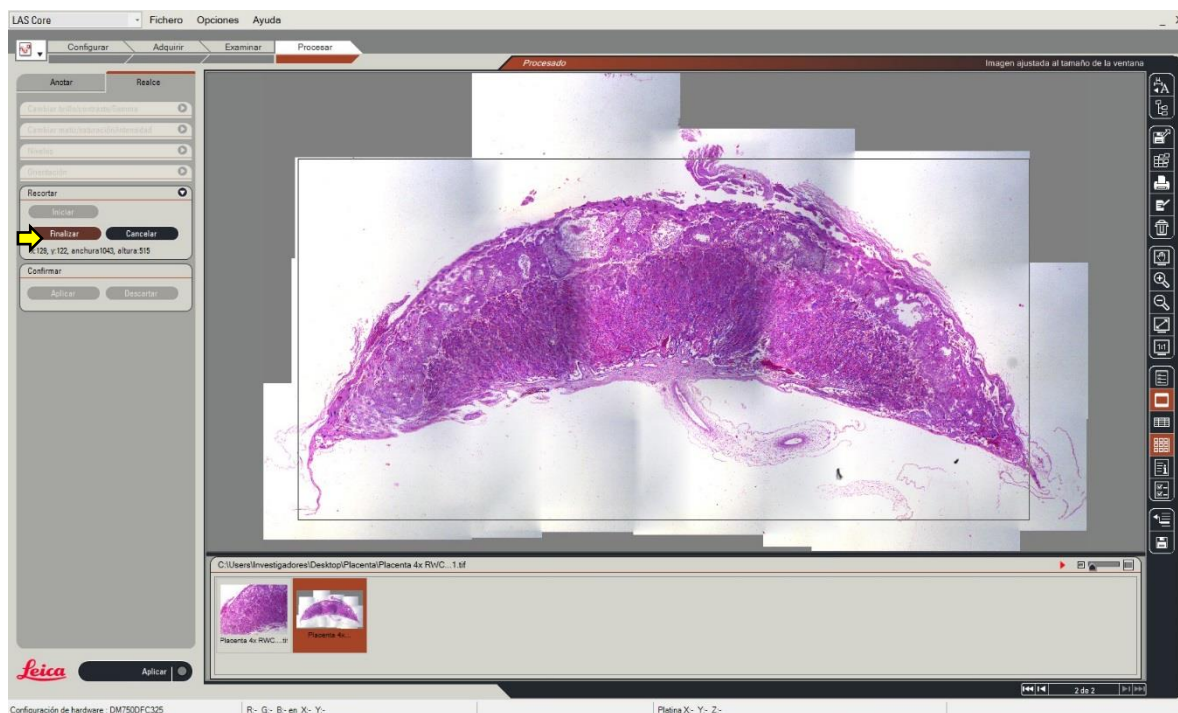


Figura 13: Finalización del recorte de la imagen reconstruida.

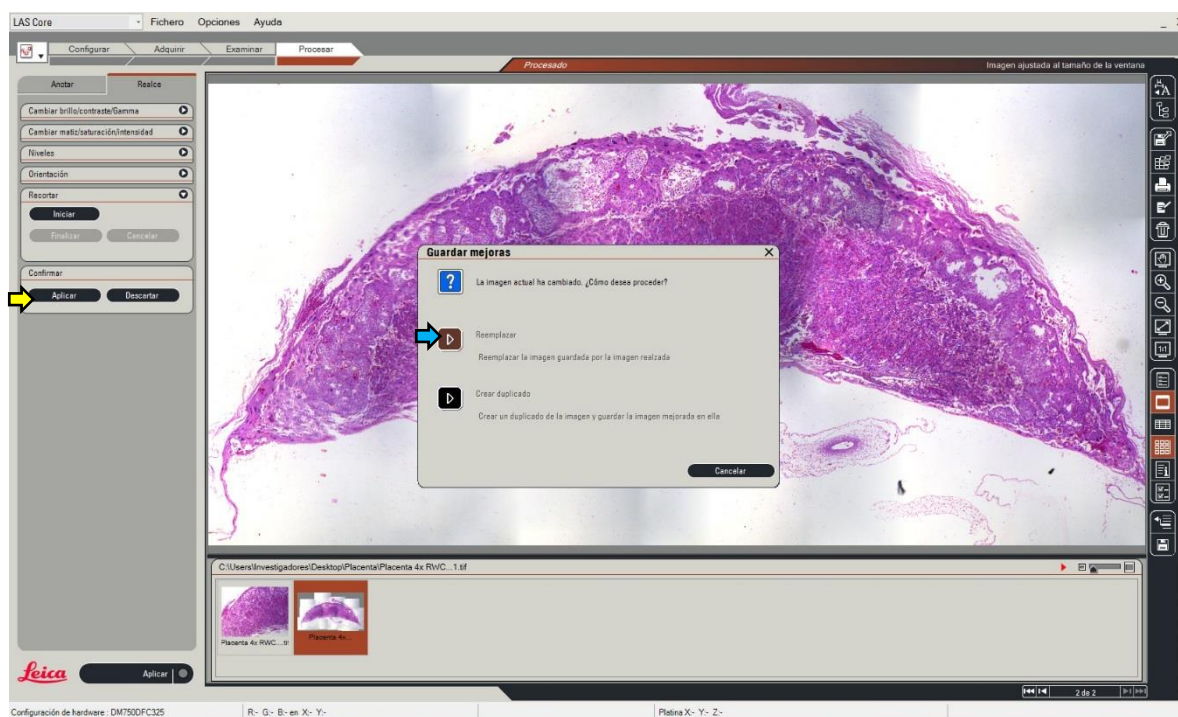


Figura 14: Imagen recortada y almacenamiento. Flecha amarilla, opción “aplicar”; flecha azul, opción “reemplazar”.

C. Calibración de la aplicación LASV4.7

1. Se debe colocar la reglilla de calibración (Olympus) 1/100= 0.01mm, en el microscopio, enfocarla en el objetivo de 10x y realizar la captura, seleccionando la pestaña “adquirir” en la parte superior de la ventana, luego dar click en la parte inferior, en la opción “adquirir imagen” y guardar en la carpeta de almacenamiento, previamente seleccionada (Fig.15).

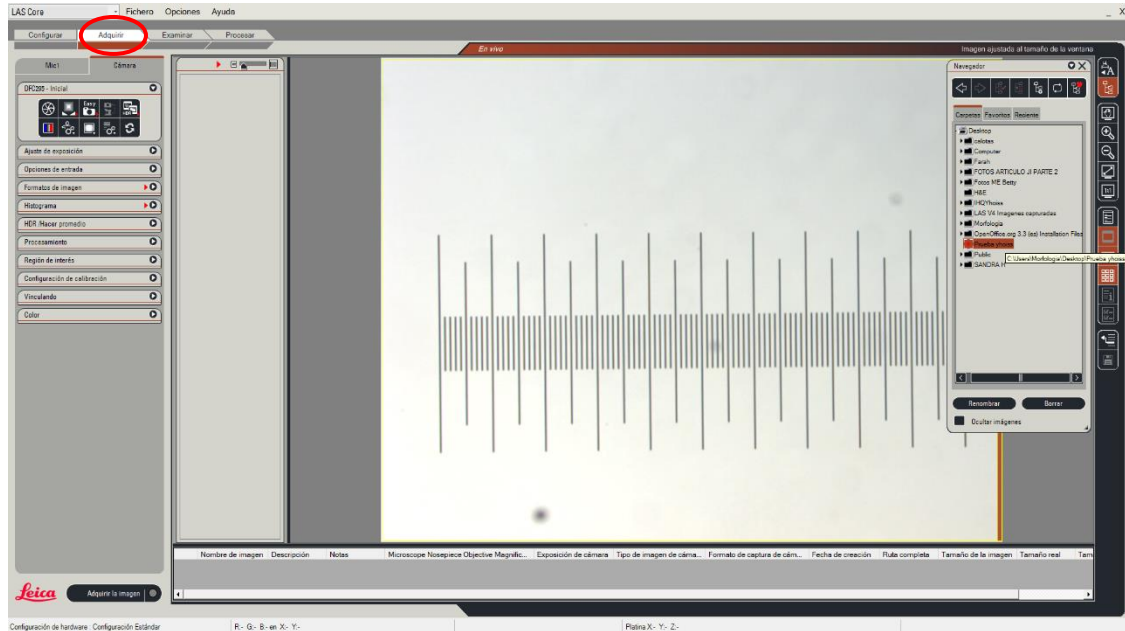


Figura 15: Capturar imagen de la regleta de calibración.

2. Seleccionar la pestaña “examinar” y luego “opciones”(Fig. 16).

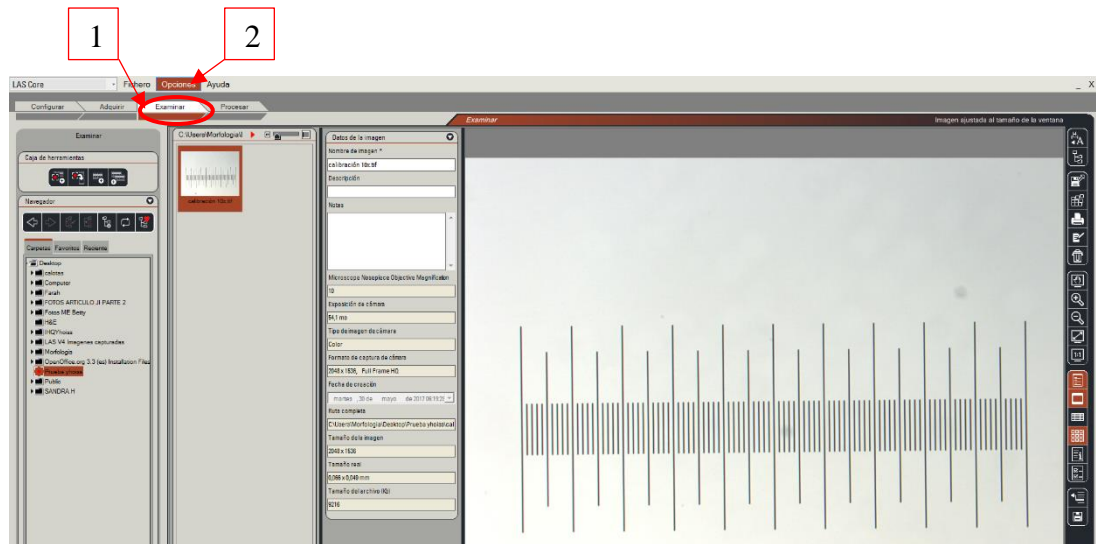


Figura 16: Ruta para realizar la calibración

3. En opciones seleccionar “actualizar calibración” (Fig. 17)

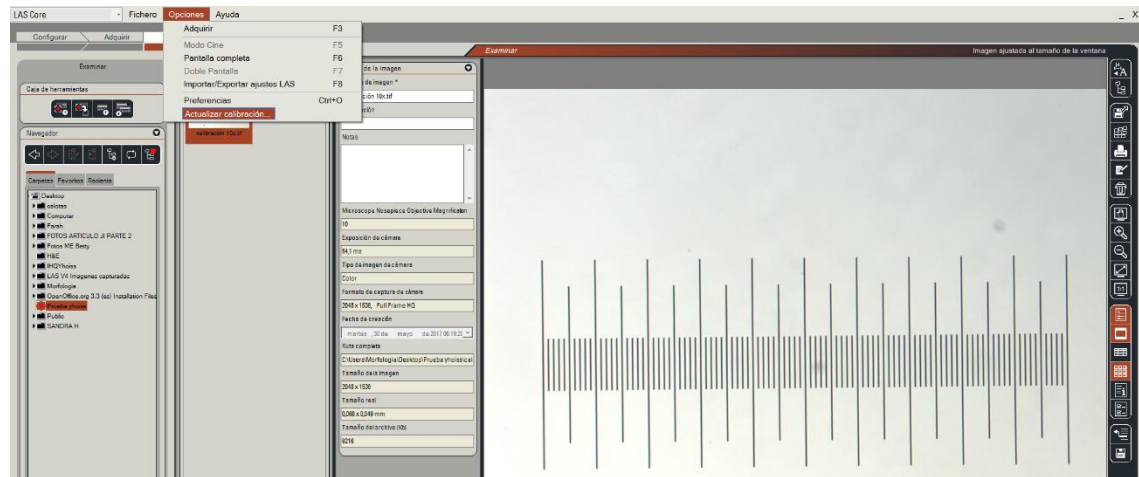


Figura 17: Continuación de ruta para realizar la calibración.

4. Seleccionar “manual desde línea de medición” (1), con la línea roja medir la imagen de la regleta (2), en “longitud” colocar la cantidad a la que equivale la medición (3) y luego “aplicar” (4) (Fig.18).

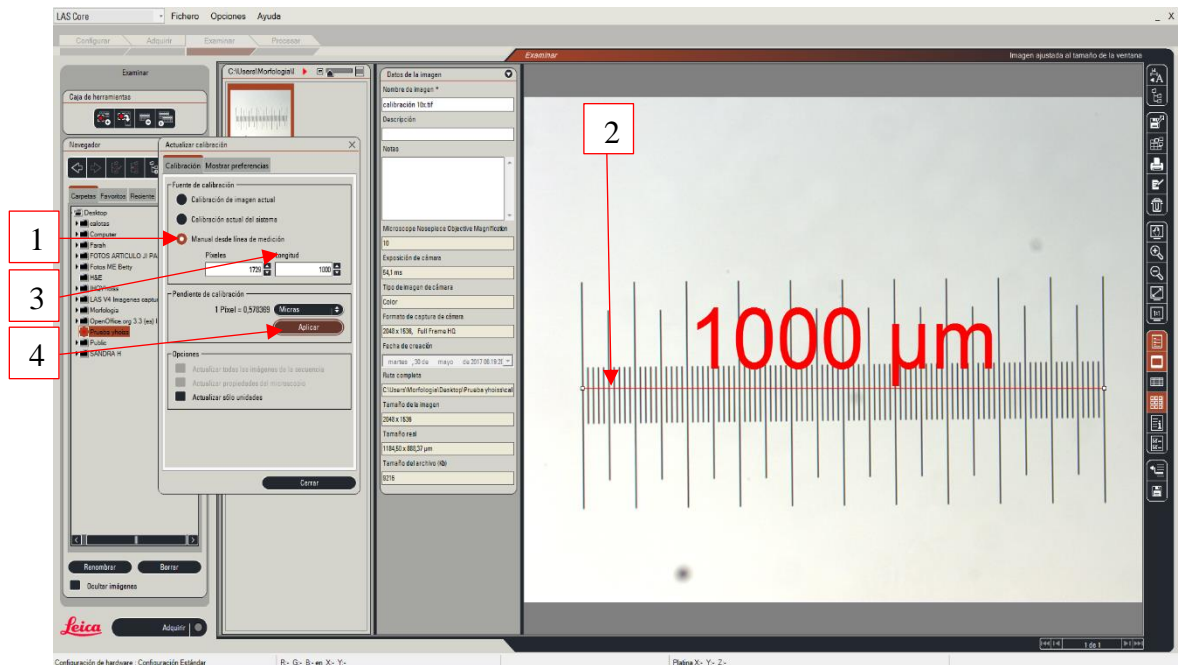


Figura 18: Calibración manual con reglilla.

D. Codificación de las fotografías

La codificación de las fotografías corresponde a la: codificación de la placa, la zona fotografiada (ZU- zona de unión ó ZL-zona de laberinto), el objetivo usado y el número de foto (Tabla 1).

Nota: Las reconstrucciones no llevan la parte de la “zona fotografiada”.

Tabla 1. Codificación de fotografías

Código de la madre	Fase	Ubicación en el útero	Mitad	Tinción	# de placa	Zona	Aumento	# foto
RWC #	FI	P# I	a	HE		ZU	4x	
RWO #	(uno)	(izquierda)	b	IHQ	#	ZL	10x	#
	FII	P# D					40x	
	(dos)	(derecha)						

Ejemplo: Zona de laberinto, foto dos de la placa RWC11FIP4Da-HE-03 capturada con objetivo de 4x

RWC11FIP4Da-HE-03-ZL- 4x- 02

E. Limpieza

Al terminar la captura de imágenes se debe limpiar la placa con toalla absorbente. **IMPORTANTE:** Al finalizar el microscopio debe quedar con la intensidad de luz mínima, diafragma del condensador en 4x, objetivo en 4x y apagado.

Se debe cerrar la aplicación LASV4.7, retirar las imágenes capturadas del computador y apagar el equipo.

Se debe diligenciar el formato de uso de equipo.

Referencias

Leica Microsystems [Internet]. 2016 [cited 20 September 2016]. Available from: <http://www.leica-microsystems.com/es/productos/software-de-microscopia/ciencias-de-los-materiales/detalles/product/leica-las-live-image-builder/>

ANEXO 5: Protocolo para la realización de medidas placentarias con image-pro plus

Introducción

Existen diversos software para el análisis de imágenes, que permiten procesar y obtener información de imágenes capturadas con cámaras acopladas a microscopios. Uno de los software ampliamente utilizado para el análisis de imágenes es el Image-Pro Plus que proporciona varias herramientas de captura, procesamiento, medida, archivo, análisis, entre otras funciones.

Objetivo

Realizar mediciones en imágenes de cortes de placentas de biomodelos murinos

Muestra

Imágenes de placentas de 16.5 días de gestación de rata Wistar obtenidas mediante técnica histoquímica coloreadas con hematoxilina-eosina

Materiales

1. Imágenes adquiridas con LASV4.7

Software

1. Image-Pro Plus

Procedimiento

Durante la captura previa de imágenes, se debe capturar una imagen de la regleta con cada objetivo, usado para la obtención de imágenes placentarias destinadas al análisis.

A. Calibración

Abrir el programa Image-Pro Plus y calibrar: Se utiliza la regleta de calibración Olympus, 0.01mm (1/100) para cada aumento (4x, 10x, 40x y 100x).

1. Abrir imagen de la regleta (Fig.1).
2. Seleccionar la pestaña “measure” de la barra de herramientas (Fig 2).
3. Seguir la ruta “calibration” - “spatial” (Fig. 2).
4. En el cuadro de diálogo de “Spatial calibration” (imagen Fig. 3):
 - a) Seleccionar la opción “New”- Create a new spatial calibration”.
 - b) Colocar el nombre de la calibración (placenta 4x, placenta 10x y placenta 40x), en la opción “name” y dar clic en la opción “System”
 - c) En la opción “Unit”, seleccionar micras (μm) como unidad de medida.
 - d) Seleccionar la pestaña de “Image”
 - Escoger la cantidad de micras (μm) a medir en la regleta y dar clic sobre el icono verde del recuadro de “scaling” (Fig. 4).

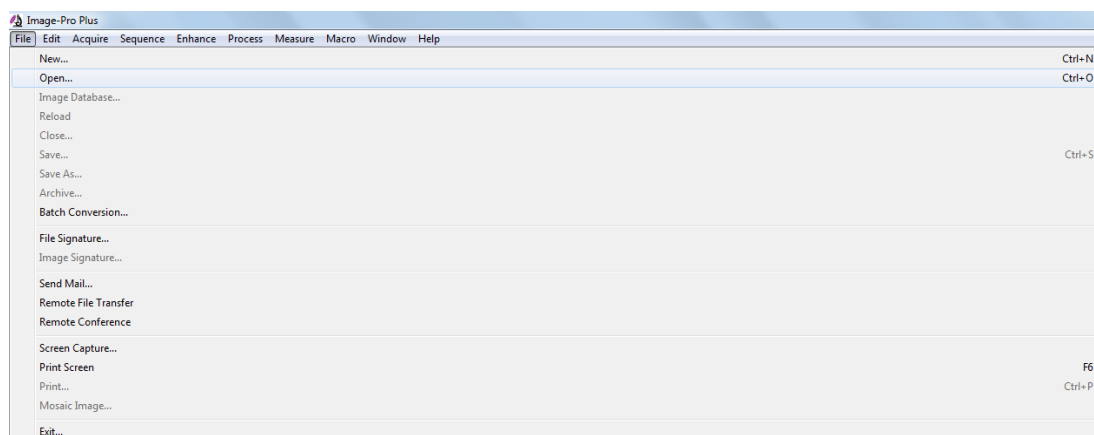


Figura 1: Ruta para abrir una imagen en Image-Pro Plus.

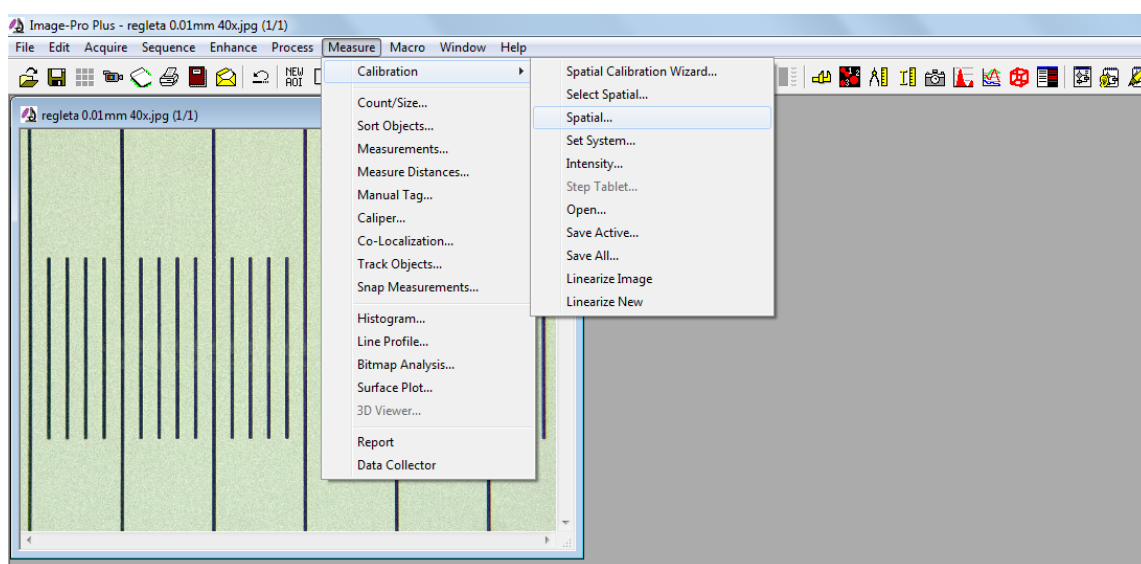


Figura 2: Ruta para abrir la pestaña de calibración.

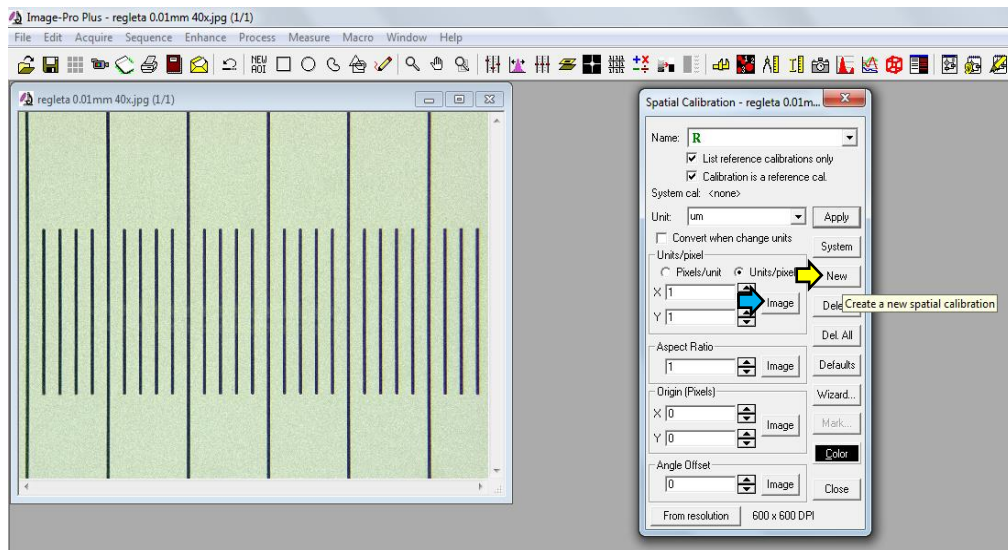


Figura 3: Cuadro de diálogo “Spatial calibration”. Flecha amarilla, opción “Create a new spatial calibration”; flecha azul, opción “image”.

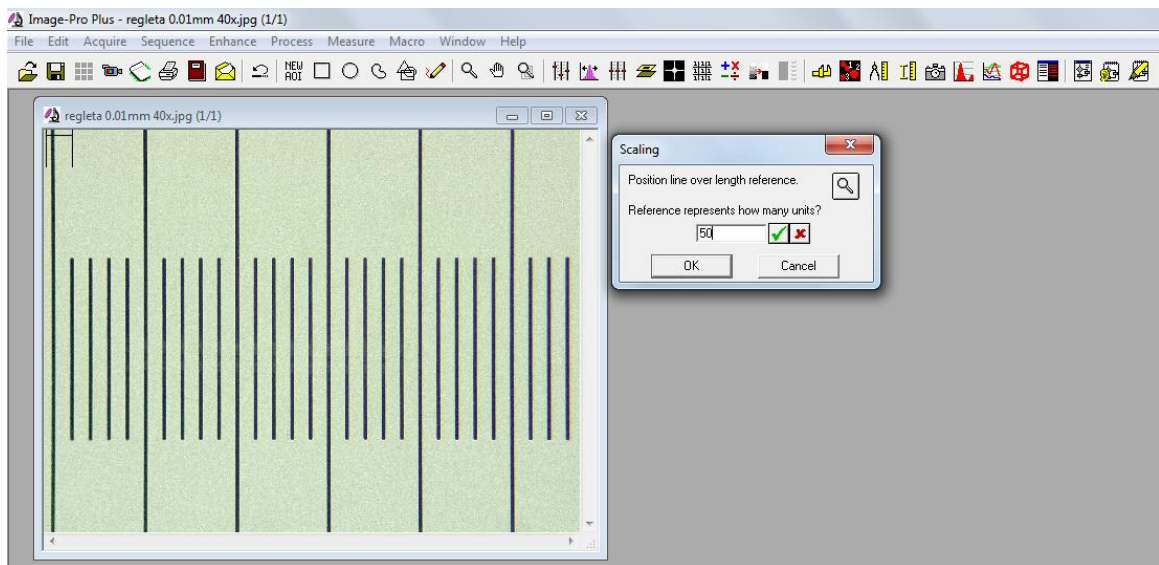


Figura 4: Escala para calibración.

- Medir la imagen de la regla con la herramienta de escala usando el clic izquierdo sostenido, una vez terminada la medición dar clic en “ok” (Fig. 5).
- Dar clic en la opción “apply”, del cuadro de diálogo de “Spatial calibration” (Fig.3).

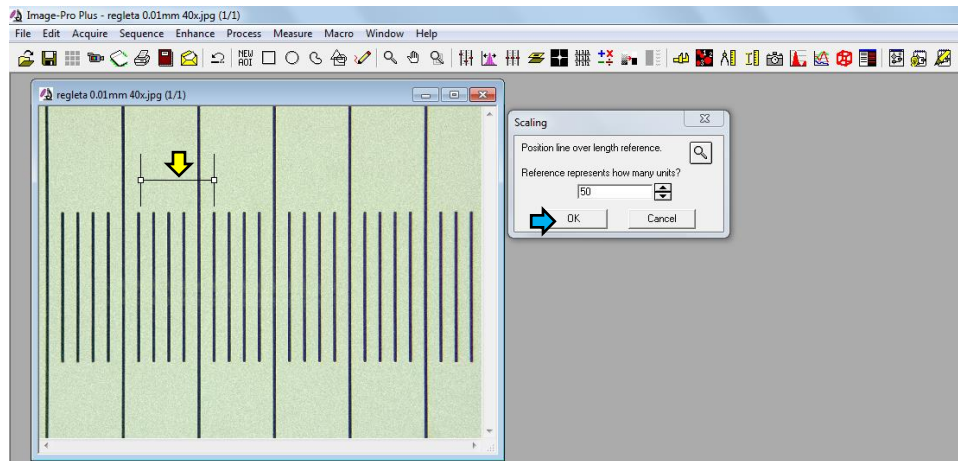


Figura 5: Medición de la regleta de calibración. Flecha amarilla, herramienta de escala; flecha azul, opción “ok”.

Nota: La calibración debe realizarse para cada aumento

5. Abrir la foto a medir, seleccionar la opción “spatial calibration” y escoger la calibración para el aumento específico de la imagen (placenta 4x, placenta 10x y placenta 40x), y dar clic en “ok” (Fig. 6). En el mismo cuadro de diálogo se encuentra la opción “Marker”, que coloca la regleta de referencia en la imagen, se debe seleccionar la dimensión de la escala en “Marker length” y dar “ok” (Fig. 7).

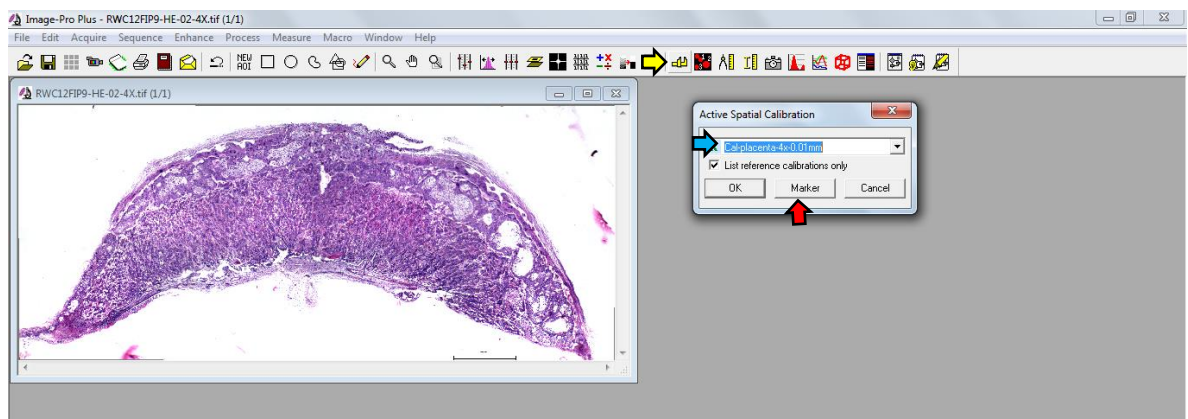


Figura 6: Selección de la calibración específica para cada imagen a analizar. Flecha amarilla, opción “spatial calibration”; flecha azul, selección de la calibración; flecha roja, opción “Marker”, coloca regleta en la imagen.

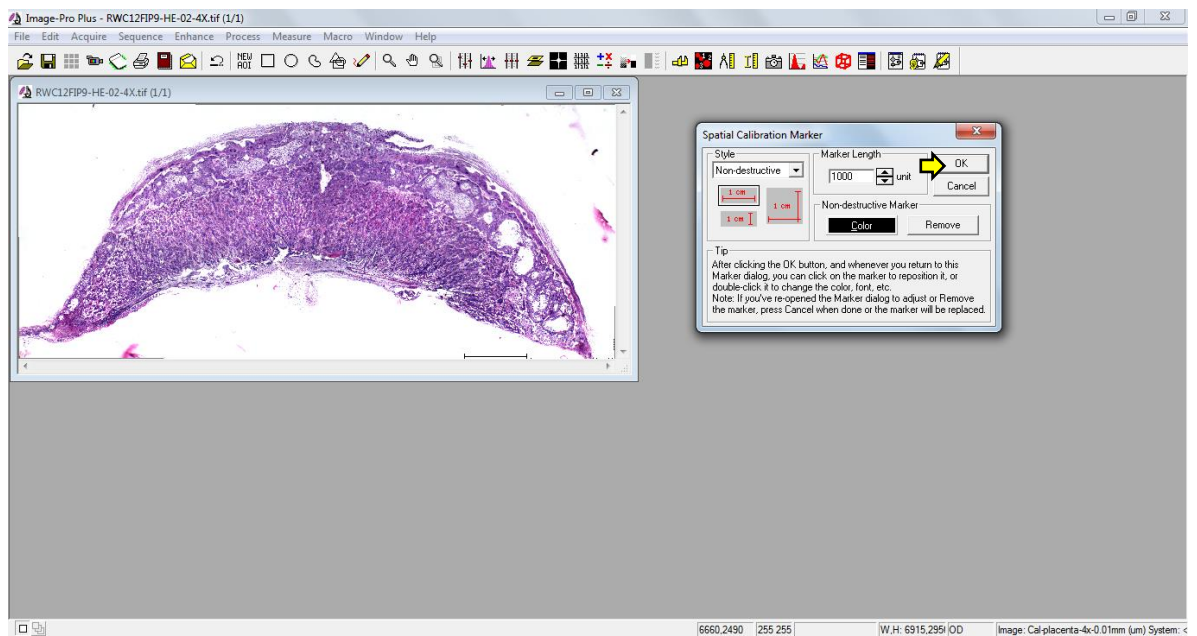


Figura 7: Cuadro de diálogo de la opción “Marker”.

6. Para iniciar las mediciones de grosor, dar clic en la opción de la barra de tareas “Measure lengths and distances” (Fig. 8).

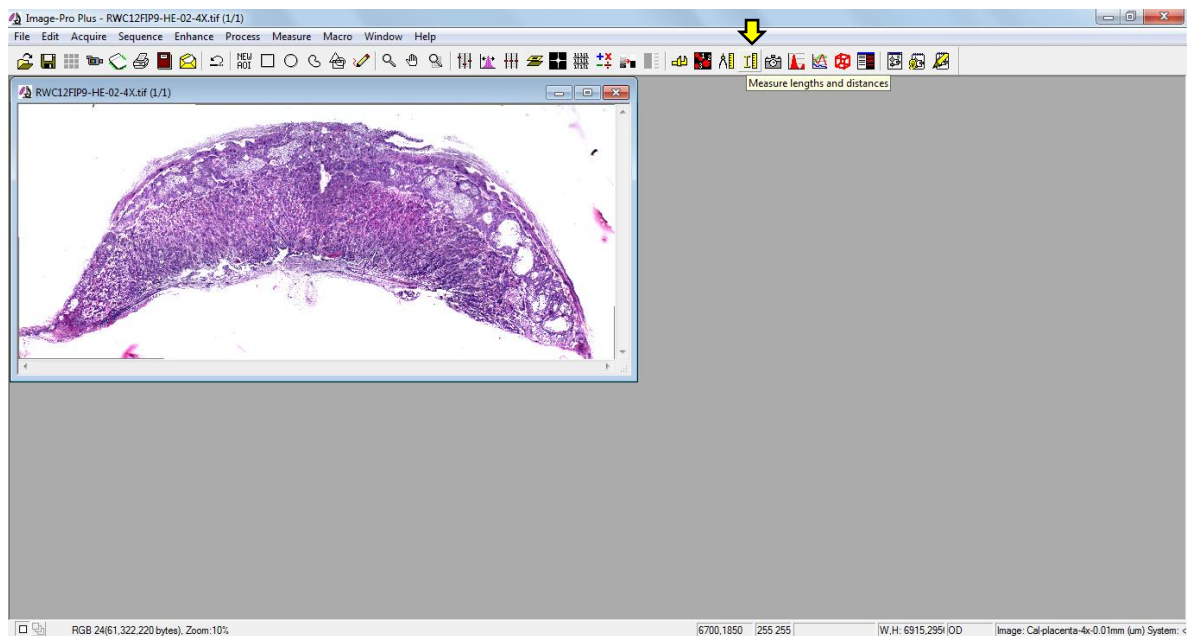


Figura 8: Herramienta de medición, “Measure lenghts and distances” (flecha amarilla).

7. Hacer zoom al 25%, en las imágenes para realizar las mediciones correspondientes (Fig. 9).

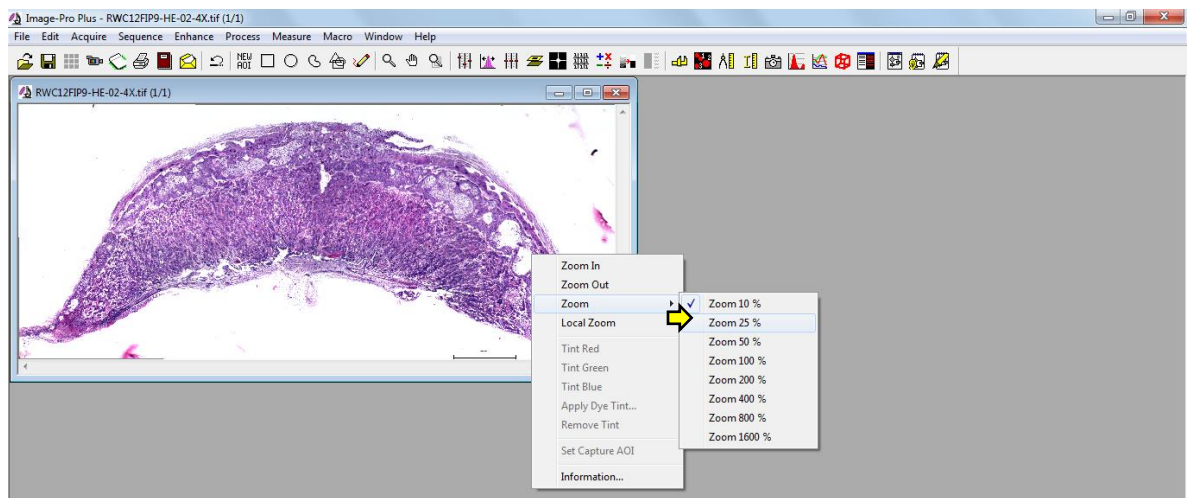


Figura 9: Zoom de las imágenes a medir.

8. Usando la herramienta de medición de longitudes y distancias, se traza una línea central perpendicular al punto de inserción del cordón umbilical, la cual atraviesa toda la muestra placentaria, luego se trazan dos líneas paralelas a ella, una a cada lado, con una distancia interlineal de aproximadamente 800 micras, esto se hace para determinar el grosor placentario central. Del mismo modo, se trazan las mismas tres líneas, pero con la diferencia de que sólo abarquen la zona del laberinto y así determinar el grosor de esta zona. (Fig. 10 y 11).

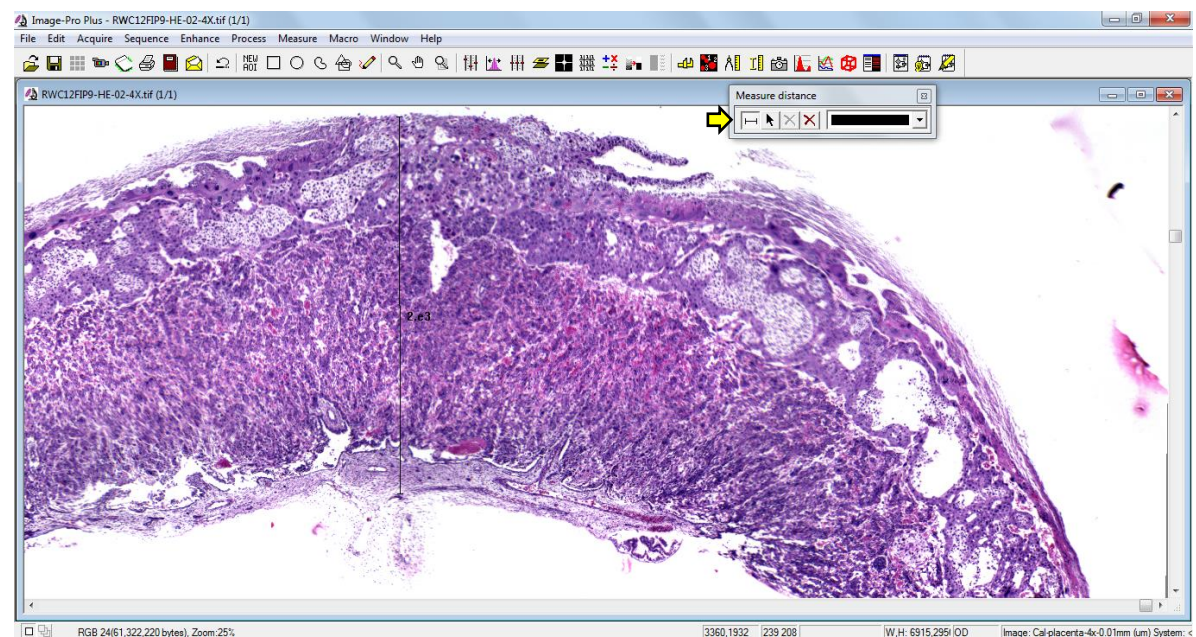


Figura 10: Uso de la herramienta de "Measure distance".

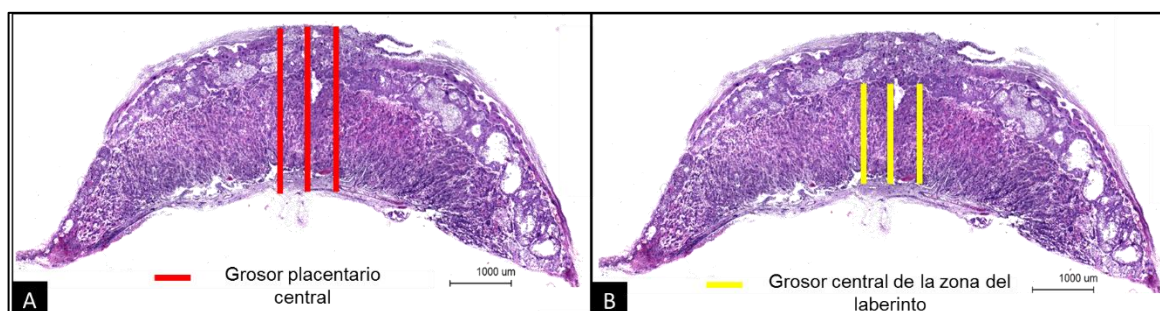


Figura 11: Medición del grosor. A. Grosor placentario central. B. Grosor central de la zona del laberinto.

9. Usar la herramienta de captura “snap picture of image with measurement overlays” y guardar la imagen nueva con la codificación establecida (tabla 1), (Fig.12).

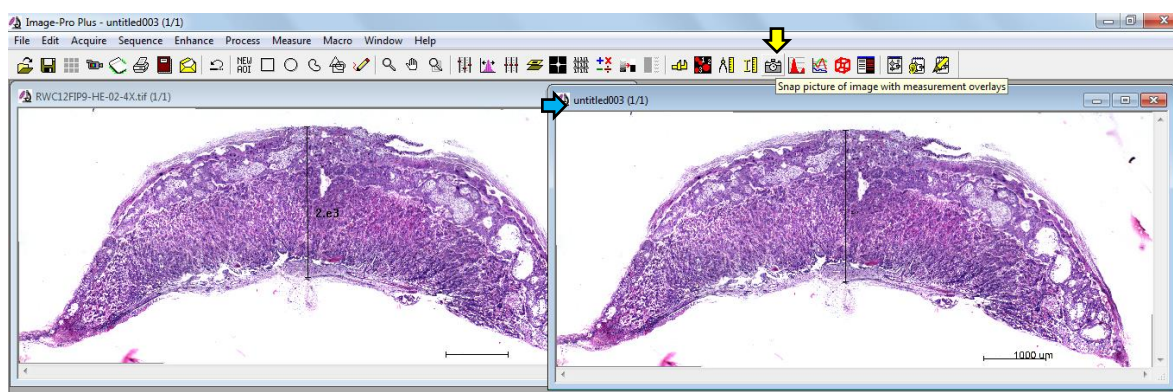


Figura 12: Captura y almacenamiento de imagen con mediciones. Flecha amarilla, opción “snap picture of image with measurement overlays”; fleche azul, nueva captura de la imagen con mediciones.

10. Para iniciar la mediciones de área, dar clic en la opción de la barra de tareas “Manual measurements” y en el cuadro de diálogo que se abre, seleccionar el icono, “create polygon feature” (Fig.13).

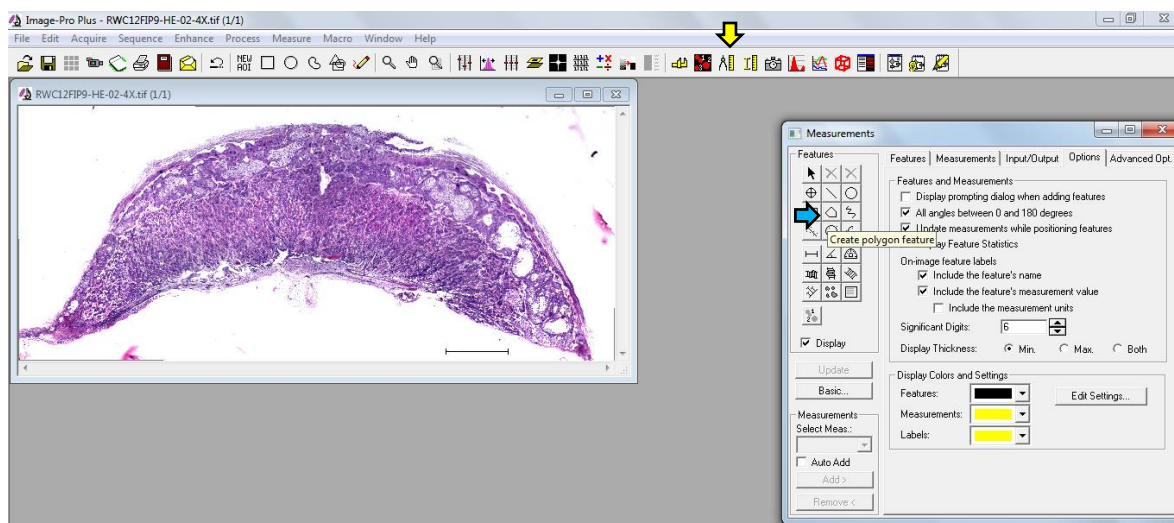


Figura 13: Medición de áreas. Flecha amarilla, opción “Manual measurements”; flecha azul, opción “create polygon feature”.

11. Una vez seleccionada la opción “create polygon feature”, medir el área placentaria total y el área de la zona del laberinto. Esto se hace demarcando el área a medir con el clic izquierdo, y finalizada la medición, dar clic derecho para obtener la información numérica de la medida (Fig. 14 y 15). Finalizada la medición se procede a capturar la imagen con la opción “snap picture of image with measurement overlays” y a guardar la imagen con la codificación establecida (tabla 1).

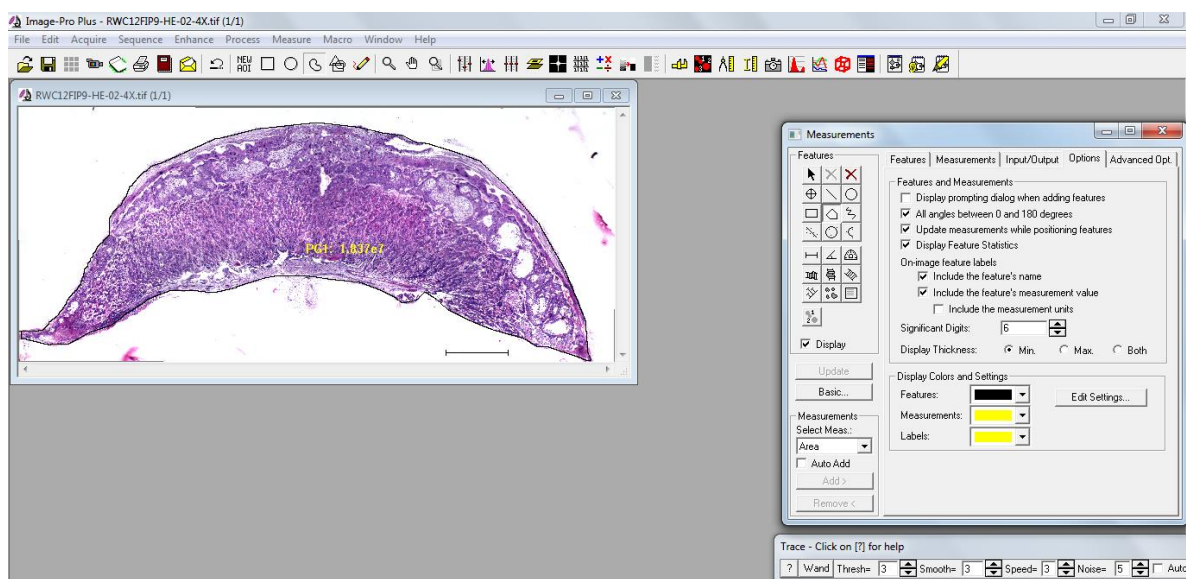


Figura 14: Continuación de la medición de áreas.

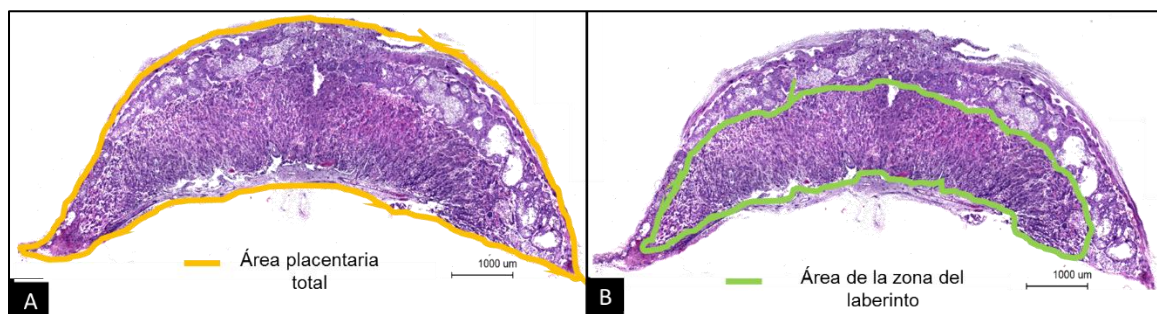


Figura 15: Medición área. A. Área placentaria total. B. Área de la zona del laberinto.

B. Codificación de las fotos

Se coloca la misma codificación de la imagen original y se agrega el código de la medición indicado en la siguiente tabla:

Tabla 1. Las medidas placentarias

Medida	Sufijo
Grosor placentario total (derecha)	COM1
Grosor placentario total (central)	COM2
Grosor placentario total (izquierda)	COM3
Grosor de la zona de laberinto (derecha)	ZL1
Grosor de la zona de laberinto (central)	ZL2
Grosor de la zona de laberinto (izquierda)	ZL3
Área placentaria total	APCOM
Área de la zona del laberinto	AZL

Referencias

Image-Pro Plus | Software de imagen | Sistemas de visión Artificial para CIENCIA | INFAIMON [Internet]. Infaimon.com. 2016 [cited 20 September 2016]. Available from: <http://www.infaimon.com/es/image-pro-plus>

ANEXO 6: Protocolo para la realización de marcación con anti- PECAM1/CD31 en combinación con anti- α -actina

Introducción

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten el marcaje selectivo de componentes celulares que pueden ser de interés diagnóstico o investigativo. En la marcación de moléculas de interés se emplean anticuerpos con alta especificidad y afinidad para unirse a la molécula diana. La inmunoperoxidasa es uno de los métodos más usados, se basa en la reacción antígeno-anticuerpo y consta de dos pasos, en el primero la muestra se incuba con un anticuerpo primario para permitir la unión específica al antígeno; en el segundo paso, la muestra se incuba con un anticuerpo secundario acoplado a enzima peroxidasa, formando un complejo que se une al anticuerpo primario y permite el posterior revelado. La diaminobencidina (DAB) actúa como sustrato de la enzima peroxidasa permitiendo la visualización de la molécula diana, mediante la generación de un color marrón que se precipita en el sitio de reacción.

La mayoría de los tejidos fijados con sustancias químicas requiere una etapa de recuperación antigénica antes de proceder a la detección inmunohistoquímica. Dicho paso es necesario, ya que durante la fijación se forman puentes de metileno, que provocan la reticulación de las proteínas y, por tanto los sitios antigénicos se enmascaran. Los dos métodos de recuperación antigénica más comunes son: 1) recuperación de epítomos mediada por calor y 2) recuperación enzimática. Ambos métodos de recuperación antigénica sirven para romper los puentes de metileno y exponer los sitios antigénicos para facilitar la unión al anticuerpo.

Objetivo

Demostrar la expresión de PECAM1/CD31 en vasos fetales de la zona de laberinto placentario

Muestra

Placas de placentas de 16.5 días de gestación de rata Wistar en portaobjetos cargados

Elementos de protección

- | | | |
|---------|----------|------------|
| 1. Bata | 2. Gafas | 3. Guantes |
|---------|----------|------------|

Reactivos

1. Alcohol 95% y 100%
2. Xilol
3. Tri-sodio citrato dihidratado
4. Ácido cítrico

5. Anti- PECAM1/CD31, IgG policlonal de conejo (0.5 mg/mL) MyBiosource
6. Anti- α actina, IgG monoclonal de ratón (200 μ g/mL) Santa Cruz
7. PBS (Buffer fosfato salino)
8. PBS-T (PBS-Tween)
9. Tritón X-100
10. Peróxido de hidrógeno al 30%
11. Hematoxilina de Harris
12. Kit de detección con anticuerpo secundario, UltraVision LP Value Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen

Equipos

1. Balanza analítica
2. Cámara extractora (FEX 120)
3. Microscopio de luz
4. Micropipetas
5. Agitador magnético
6. pH metro

Materiales

1. Vasos de precipitado
2. Erlenmeyer
3. Probeta
4. Coplin
5. Espátula
6. Recipientes para pesar
7. Cubreobjetos
8. PAN PEN (marcador hidrofóbico)
9. Cámara húmeda
10. Puntas de pipeta

Procedimiento

A. Preparación de reactivos

Para la preparación de cada solución se toma el reactivo de su recipiente con ayuda de una espátula limpia y pesar en la balanza utilizando un recipiente de plástico, medir con la bureta la cantidad de agua destilada necesaria, depositar el agua en un vaso de precipitado, agregar el reactivo pesado, colocar en el agitador y utilizar el magneto para disolver el soluto.

Buffer citrato de sodio pH 6.0, 0.01M

Solución A: Solución 0.1M de ácido cítrico	Solución B: 0.1M de citrato sódico
21.01g en 1000mL de agua destilada	29.41g de $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ en 1000mL de agua destilada
18 mL de solución A + 82 mL de solución B, diluido en un total de 1000 mL de agua destilada. Ajustar pH	

Depositar en recipientes previamente rotulados con la fecha de preparación, el nombre de la solución, su concentración y el nombre investigador responsable. Almacenar a temperatura ambiente durante 3 meses a 4 ° C para un almacenamiento más prolongado.

Nota: los utensilios y la vidriera deben de estar limpios para preparar cada solución.

Buffer Fosfato (PBS)

Solución A	Solución B
27,6 g fosfato monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)/ 1000 ml agua destilada	Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) se disuelven 28.4 g / 1000 mL de agua destilada
130 mL solución A 0.2 M + 870 solución 0.2 M mL B = 1000 mL de Buffer fosfato 0.2 M pH 7.6	
1000 mL de PB 0.2 M pH 7.6 + 1000 mL de agua destilada = 2000 mL de PB 0.1 M pH 7.6	
Buffer fosfato salino (PBS): Por cada 1000 mL de PB agregar 8.9g de NaCl Verificar que el pH	

Nota: Conservar a 4-8 °. Es estable por tres o más meses. Desechar si aparecen cambios de coloración o presencia de precipitado.

PBS-Tween 1 litro [0,05% de Tween 20, PBS]

Tween 20	PBS
0,5 mL	1000 mL
Mezclar en un agitador magnético	

Hematoxilina de Harris

Cristales de Hematoxilina	Alcohol absoluto
5 g	50 mL
Disolver calentando suavemente	

Aluminio de potasio	Agua destilada
100 g	1000 mL
Disolver en caliente. Añadir la solución de hematoxilina y llevar a ebullición. Cuando comienza a hervir se añade 2.5 g de óxido de mercurio (rojo) 2.5 g.	
Dejar disolver el óxido removiendo lentamente hasta que la solución adquiera color púrpura. Sumergir inmediatamente en agua fría. Cuando la solución se haya enfriado, filtrar y añadir 50 mL de ácido acético glacial.	

Nota: Filtrar de nuevo antes de usarla. Almacenar en un frasco opaco y bien cerrado.

BSA (Albumina bovina) 5%

BSA	PBS-T
5 g	100 mL
Dejar reposar hasta disolver	

Peróxido de hidrógeno al 3%

Peróxido de hidrógeno al 30%	Agua destilada
10 mL	100 mL
Mezclar en un agitador magnético	

Anticuerpos primarios 1:10

Anti-CD31 o Anti- α -Actina	TBS-T
10 μ L	90 μ L

B. Preparación del lugar de trabajo

El lugar para realizar el procedimiento deberá estar limpio, con buena iluminación y se deben tener listos los materiales que se necesitaran para todo el procedimiento.

C. Técnica

Día I

1. Hidratación y desparafinación

- Xilol 1 (30 segundos)
- Xilol 2 (30 segundos)
- Xilol 3 (30 segundos)
- Xilol 4 (30 segundos)
- Alcohol 100% 1 (30 segundos)

- Alcohol 100% 2 (30 segundos)
 - Alcohol 100% 3 (30 segundos)
 - Alcohol 95% 1 (30 segundos)
 - Alcohol 95% 2 (30 segundos)
 - Alcohol 95% 3 (30 segundos)
 - Lavado en agua corriente
2. Recuperación antigénica en vaporera durante 15 minutos, luego de precalentar el coplin y el buffer citrato durante 20 minutos
 3. Dos lavados en PBS de cinco minutos cada uno
 4. Aplicación del marcador hidrofóbico en los bordes de la placa
 5. Incubación con peróxido de hidrógeno al 3% durante cinco minutos en cámara humedad
 6. Dos lavados en PBS de cinco minutos cada uno
 7. Aplicación del anticuerpos primarios (10 μ L anti-CD31 + 10 μ L anti- α -actina, por cada sección de tejido) dejar incubar en cámara húmeda por 72 horas a 4°C

Día III

1. Dos lavados en PBS de cinco minutos cada uno
2. Aplicación del anticuerpo secundario del Kit de detección (Labelled polimer-HPR) e incubación en cámara húmeda durante dos horas
3. Dos lavados en PBS de cinco minutos cada uno
4. Aplicación del HRP Polymer e incubación durante 30 minutos en cámara húmeda y cuarto oscuro
5. Dos lavados en PBS de cinco minutos cada uno
6. Revelado en DAB durante tres a cinco minutos en coplin protegido de la luz con papel aluminio (añadir una gota ó 40 μ L DAB Plus Chromogen a 1 mL de DAB Plus Substrate), agregar tres gotas de peróxido de hidrógeno, mezclar por agitación y aplicar a los tejidos
7. Observar al microscopio hasta observar coloración marrón, inmediatamente proceder a detener la reacción con agua corriente.
8. Lavado en agua corriente por cinco minutos
9. Contratinción con Hematoxilina de Harris durante 30 segundos
10. Lavado en agua corriente
11. Deshidratación
 - Alcohol 95% 1 (30 segundos)
 - Alcohol 95% 2 (30 segundos)
 - Alcohol 95% 3 (30 segundos)
 - Alcohol 100% 1 (30 segundos)

- Alcohol 100% 2 (30 segundos)
- Alcohol 100% 3 (30 segundos)
- Xilol 1 (30 segundos)
- Xilol 2 (30 segundos)
- Xilol 3 (30 segundos)

12. Montaje de las placas con Consul-mount

Nota: Se monta un control negativo (no se aplica anticuerpo primario) por cada placa

D. Eliminación de residuos

Los residuos deben descartarse en los recipientes asignados para tal fin.

El material usado debe ser lavado con jabón neutro. Dejarse secar y organizar en su sitio respectivo.

Los elementos de protección usados deben ser descartarse en bolsa roja.

Nota: El sitio de trabajo debe quedar limpio y ordenado.

Referencias

Técnicas Histológicas. 5- Tinción: Inmunocitoquímicas. Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. Mmegias.webs.uvigo.es. 2016 [cited 21 September 2016]. Available from: <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>

Villena A. Métodos histológicos [Internet]. E-histologia.unileon.es. 2016 [cited 21 September 2016]. Available from: <http://www.e-histologia.unileon.es/1inicio/home/tecnicas.htm>

Thermoscientific. UltraVision LPValue Detection System: HRP Polymer/DAB Plus Chromogen. [Internet]. 2016 [cited 21 September 2016]. Available from: <https://static.thermoscientific.com/images/D11535-.pdf>

CD31 Antibody [Internet]. Thermofisher.com. 2016 [cited 21 September 2016]. Available from: <https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD31-Antibody-Polyclonal/PA5-24411>

ANEXO 7: Protocolo para la reconstrucción de imágenes placentarias Combinación de imágenes “stitching”

Introducción

Las muestras coloreadas pueden ser observadas y evaluadas al microscopio de luz, sin embargo hoy en día existen herramientas que permiten adquirir la imagen digital completa, mediante la reconstrucción de una imagen panorámica a partir de varias imágenes. Para la toma de las imágenes se deben ajustar los parámetros de las aplicaciones usadas de acuerdo a las características de tinción y grosor que tenga la muestra, que permitan obtener una imagen unificada de alta calidad.

Objetivo

Obtener imágenes digitales panorámicas a partir de fotografías seriadas de las muestras de placenta.

Muestra

Placas de placentas de 16.5 días de gestación de rata Wistar teñidas para histoquímica o inmunohistoquímica.

Elementos de protección

1. Bata
2. Guantes

Materiales

1. Xilol
2. Alcohol isopropílico
3. Toallas absorbentes
4. Copitos de algodón

Equipos

1. Microscopio Leica DM750 con cámara acoplada DFC 295

Software

1. Aplicación LASV4.7
 - a. Herramienta de combinación de imágenes “stitching”

Procedimiento

A. Preparación del sitio de trabajo

Antes de iniciar la captura de las imágenes, se deben escoger las placas, seleccionar los cortes, limpiar las superficies de las placas con xilol y toallas absorbentes. Se debe verificar que el microscopio de luz se encuentre limpio, de lo contrario, limpiar objetivos usando alcohol isopropílico y copitos de algodón.

B. Pasos para la captura y reconstrucción.

1. Iniciar el computador.
2. Encender el microscopio.
3. Colocar la placa sobre la platina del microscopio.
4. Abrir por completo el diafragma de campo.
5. Abrir el diafragma de apertura (Diafragma del condensador).
6. Enfocar la muestra con objetivo de 4x, luego pasar al objetivo de interés.
7. Regular la intensidad de luz desde la perilla de control de iluminación.
8. Iniciar la aplicación LASV 4.7 (Fig. 1).

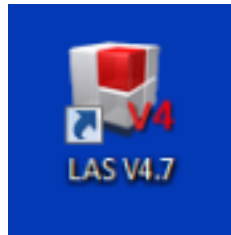


Figura 1: Icono de aplicación

9. El enfoque del microscópico, es diferente al que se proyecta en la aplicación, por lo que se debe enfocar observando a la pantalla del computador, para esto se debe verificar en la pestaña "Mic1", el objetivo seleccionado, luego ubicarse en la pestaña "adquirir", seguido de la pestaña "cámara" (Fig. 2 y 3).

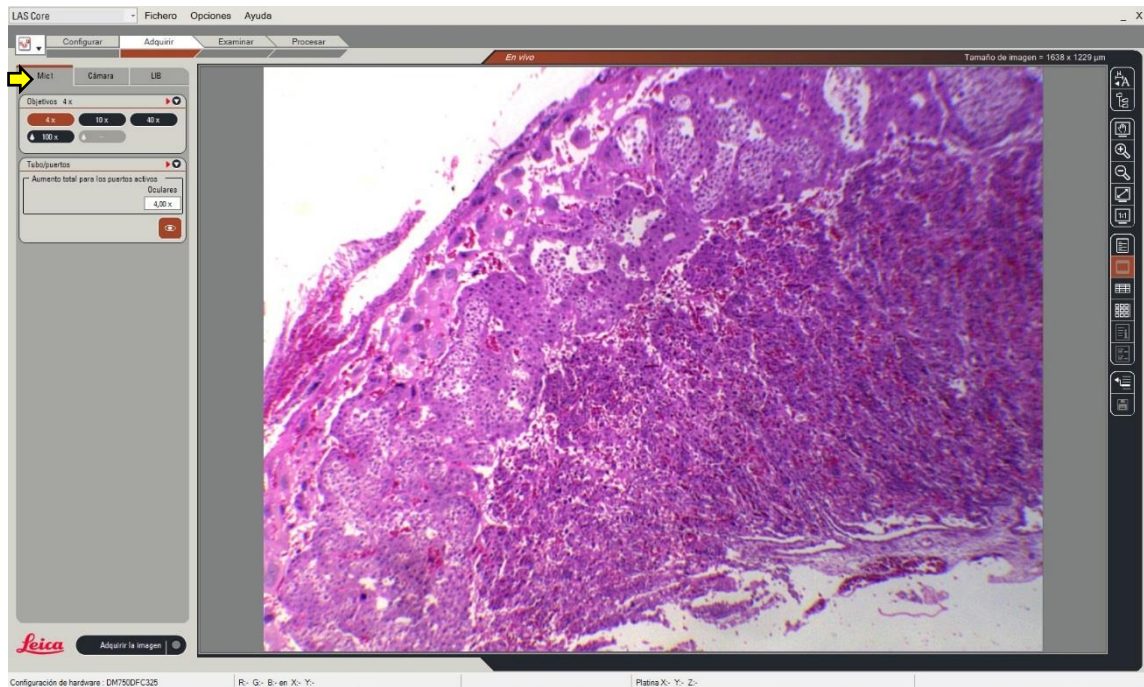


Figura 2: Verificación del objetivo seleccionado en la pestaña "Mic1" de la aplicación Las V4.7 (flecha amarilla).

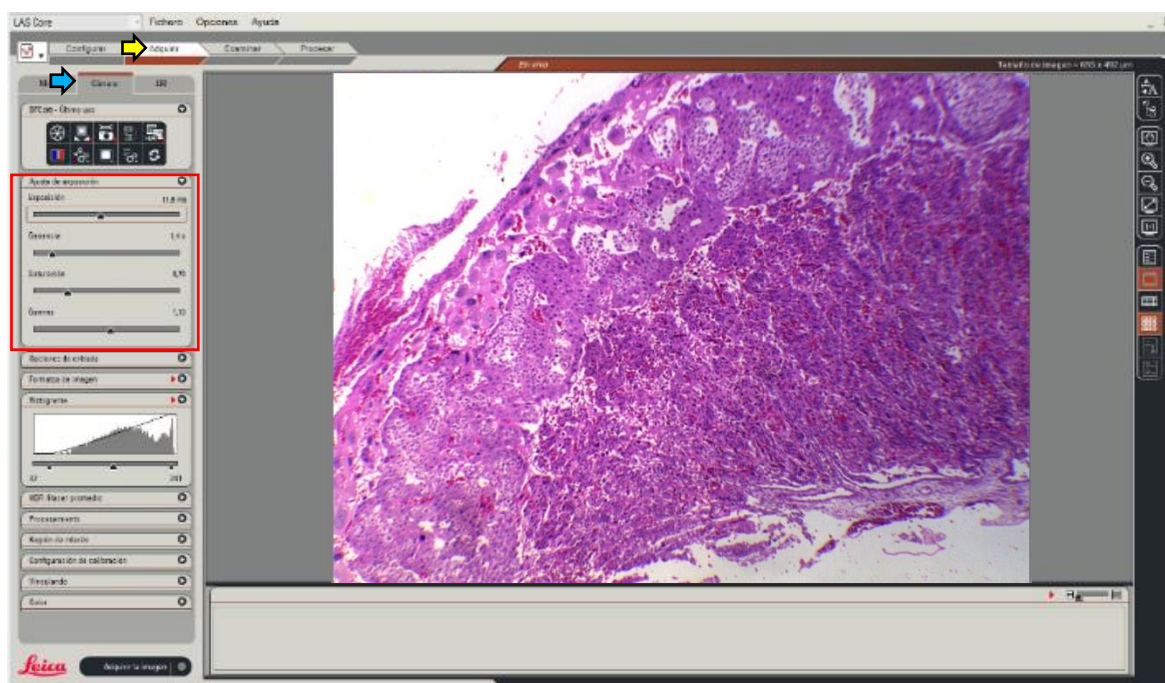


Figura 3: Enfoque de la imagen en la aplicación LASV4.7. Flecha amarilla, pestaña “adquirir”; flecha azul, “cámara.” Recuadro rojo, opciones de ajuste de exposición.

10. Ajustar los parámetros de la captura según el grosor y tinción de la muestra (Fig. 3).

Parámetro	Hematoxilina-eosina	Inmunomarcación
Exposición (10.00-50.00ms)	11.9	46.8
Ganancia (1.0x-2.5x)	1.4	1.9
Saturación (0.5-0.8)	0.7	0.8
Gamma (0.60-1.15)	1.13	0.69

11. Ajustar balance de blancos moviendo la platina hasta donde se observe una parte de la placa sin muestra y dar clic sobre el icono “balance de blancos automático...” (Fig. 4).

12. Crear carpeta para el almacenamiento de las imágenes adquiridas. Abrir el navegador de la barra de la derecha, dar clic en el icono “crear un nuevo “New folder” y seleccionar la ubicación para crear la carpeta (ej. Desktop). Escribir el nombre de la nueva carpeta (ej. Placenta...) y cerrar la ventana del navegador en la “X” (Fig. 5).

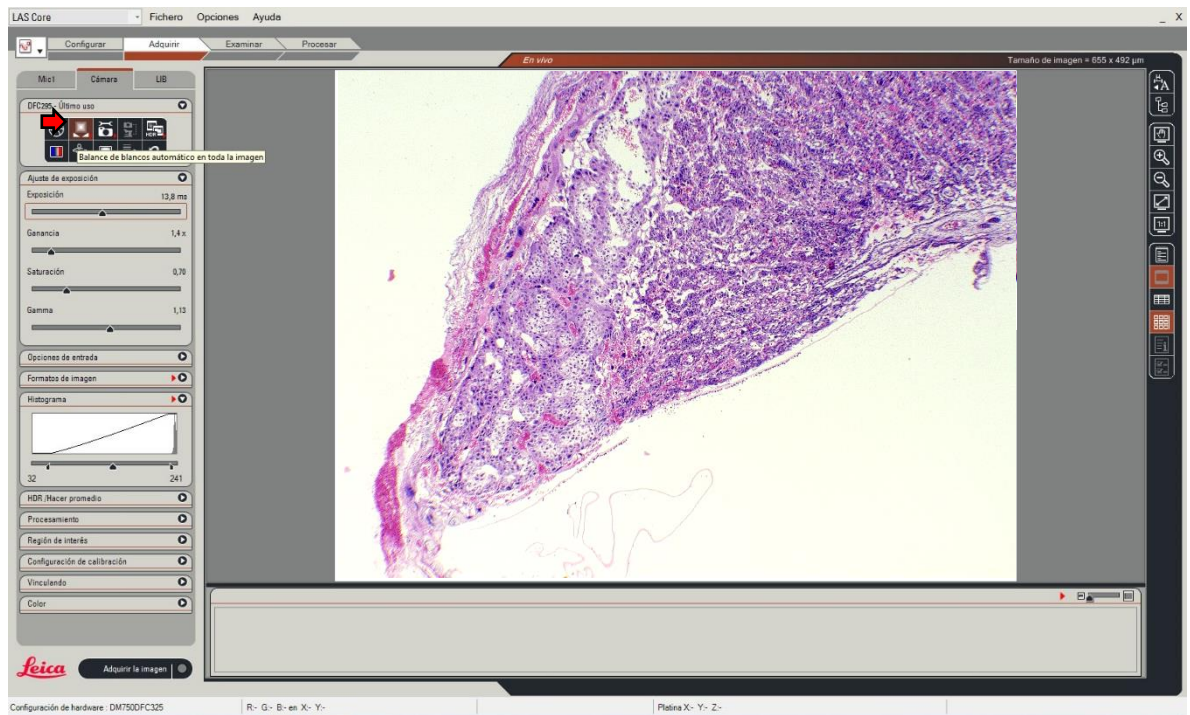


Figura 4: Ajuste de balance de blancos

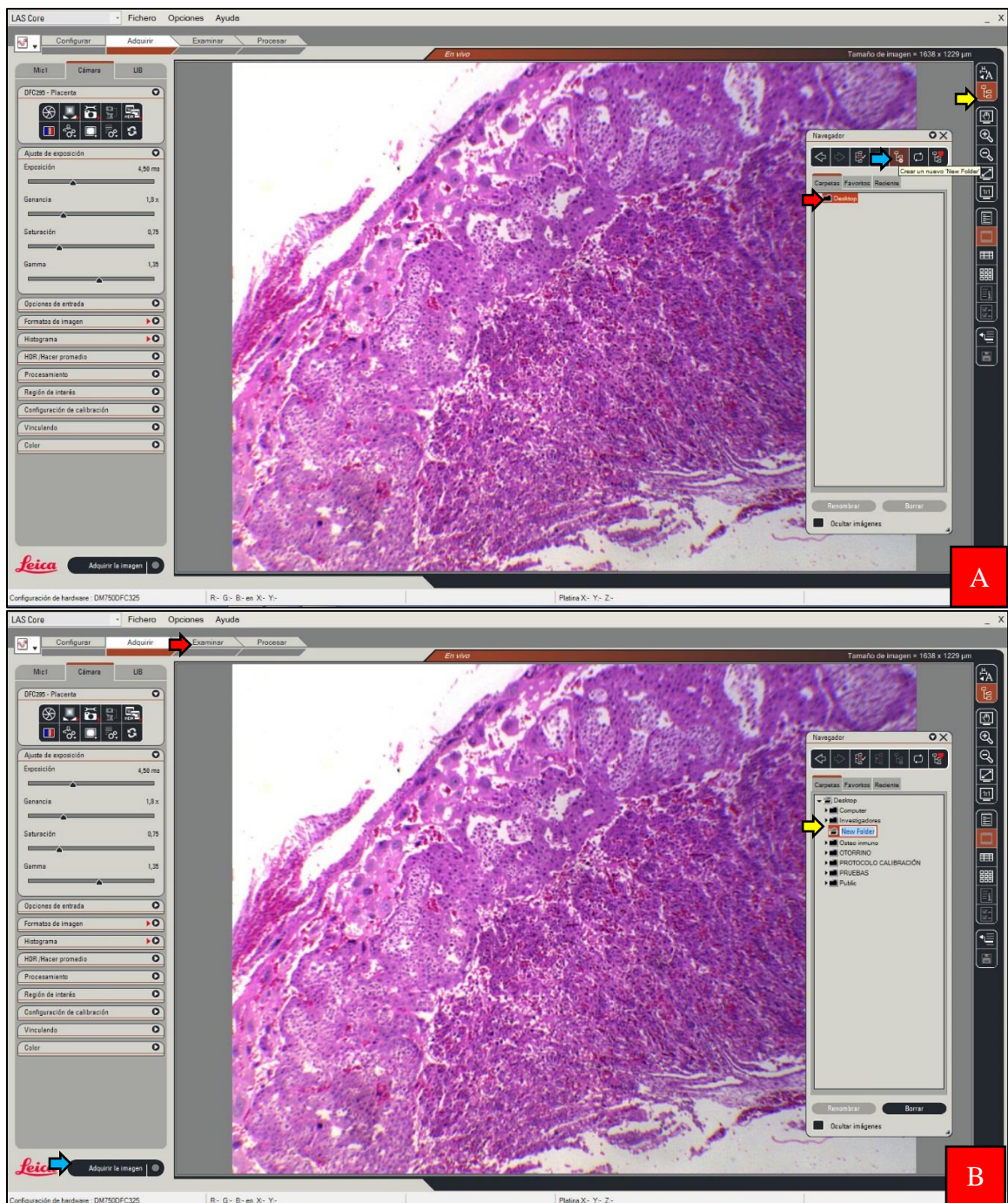


Figura 5: Creación de carpeta para guardar las imágenes capturadas. A. Flecha amarilla, primer paso; flecha azul, segundo paso; flecha roja, tercer paso. B. Flecha amarilla, nombrar carpeta; flecha azul, opción “adquirir imagen; flecha roja, pestaña “examinar.

14. Una vez ajustados los parámetros de captura, se recomienda activar el visor doble para adquirir fotos en secuencia de la imagen histológica, ya que la herramienta reconoce patrones específicos en las imágenes, que permiten la generación de una sola imagen con todas las fotografías adquiridas (Fig. 6).

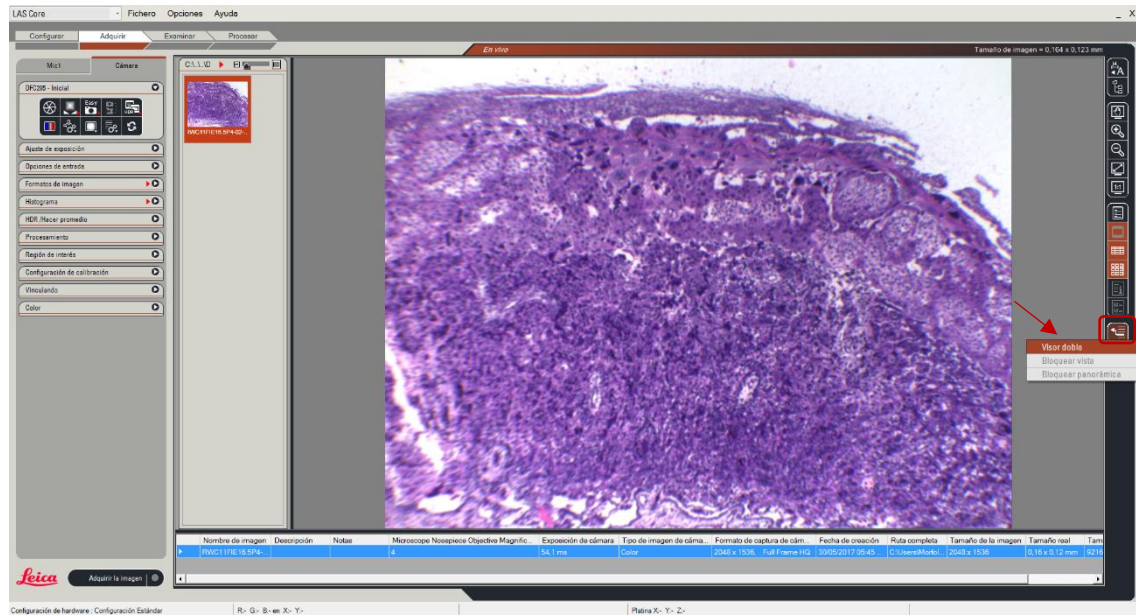


Figura 6: Activación de visor doble.

15. Se puede usar la herramienta “encontrar foco”, ubicada en la pestaña “región de interés”, del panel de herramientas de captura, para mejorar el foco de la imagen (Fig. 7).

La foto se adquiere usando la opción “adquirir imagen”, en la parte inferior izquierda de la aplicación, la imagen se puede observar utilizando la pestaña “examinar”, en la parte superior (Fig.5b).

Nota: La imagen se guarda en la carpeta previamente creada y seleccionada en el paso 12

16. Luego de adquirir todas las imágenes necesarias para la reconstrucción, seleccionar la pestaña “examinar”, en la parte superior de la ventana. Usar la tecla “ctrl” sostenida o el “mouse” para seleccionar todas las imágenes adquiridas (Fig. 8).

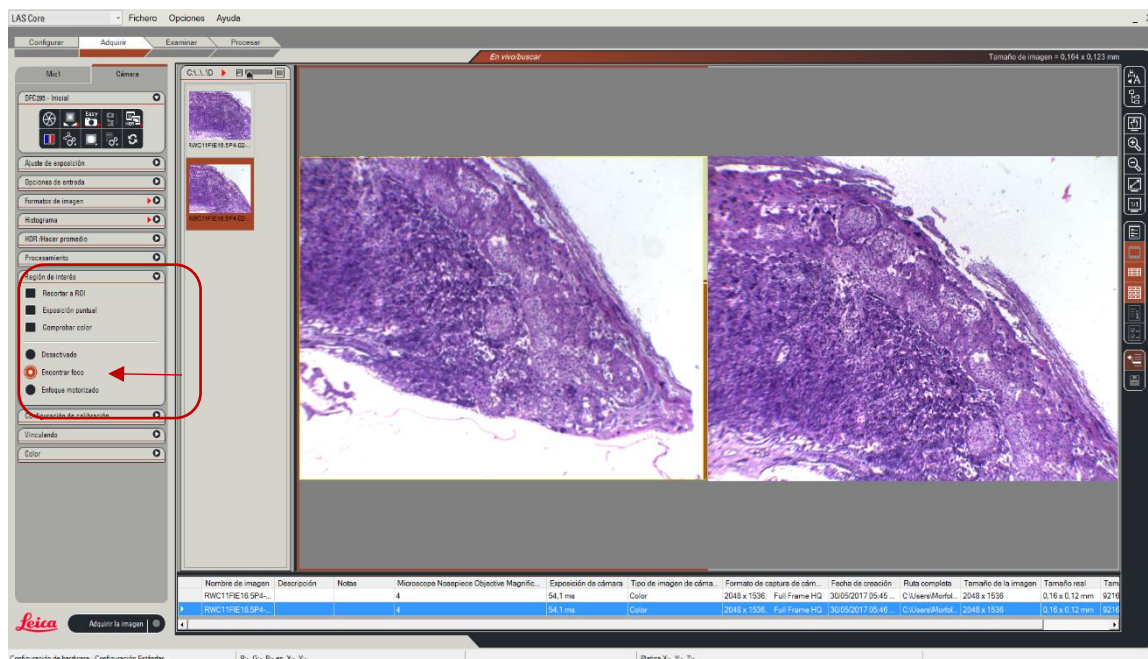


Figura 7: Herramienta para facilitar el enfoque de la imagen.

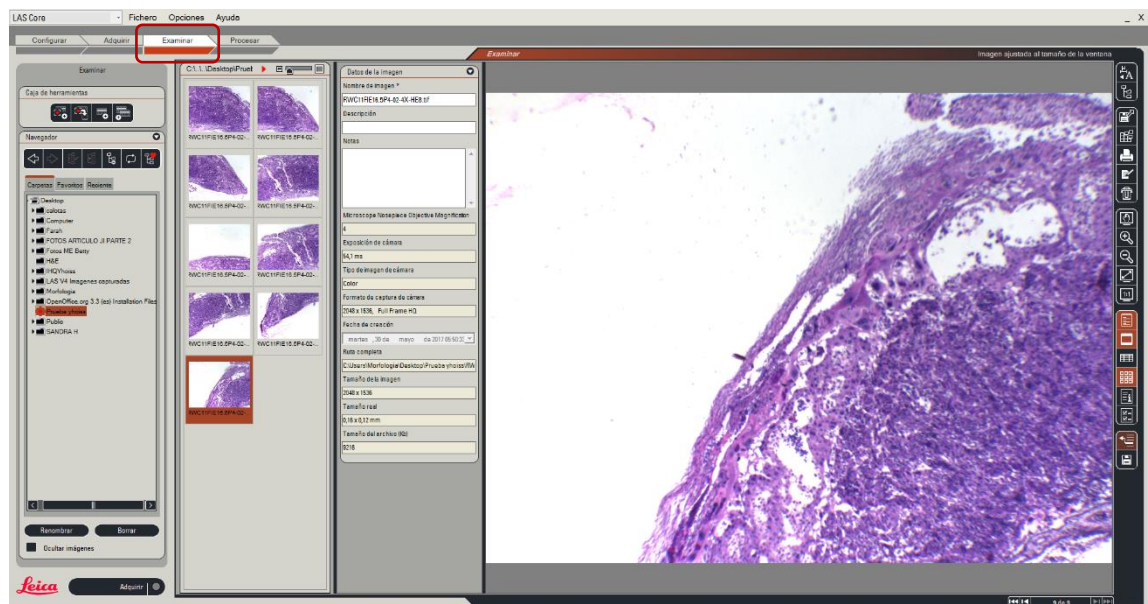


Figura 8: Selección de imágenes adquiridas desde la pestaña "examinar".

17. Seleccionar "opciones" en la parte superior de la ventana y escoger "actualizar calibración" (Fig. 9).

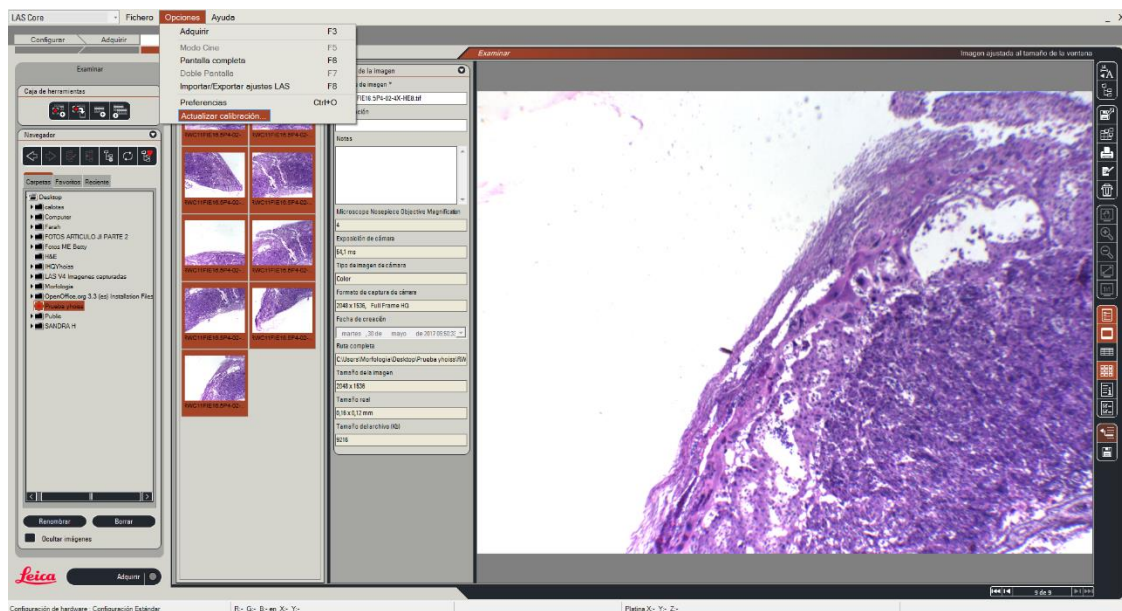


Figura 9: Actualización de la calibración de todas las imágenes adquiridas.

18. Seleccionar “manual desde línea de medición”, aparecerá la línea roja con la calibración que se hizo previamente, no cambiar nada, sólo dar “aplicar” y “cerrar” (Fig. 10).

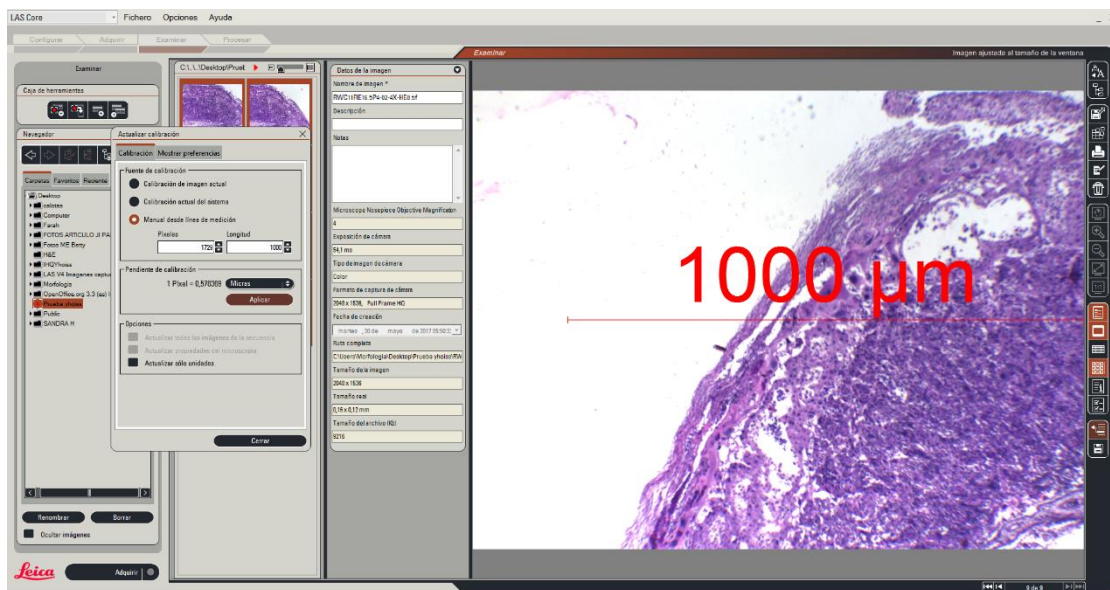


Figura 10: Aplicación de la calibración a la imágenes adquiridas.

19. La regleta de la calibración se debe colocar en una de las imágenes, antes de realizar el proceso de reconstrucción, para esto, seleccionar la pestaña “procesar” en la parte superior de la ventana, escoger una imagen, preferiblemente de la parte inferior de la muestra y en la barra de herramientas de la izquierda, seleccionar la pestaña “analizar”, luego la pestaña “barra de escala” y marcar “mostrar” (Fig. 11).

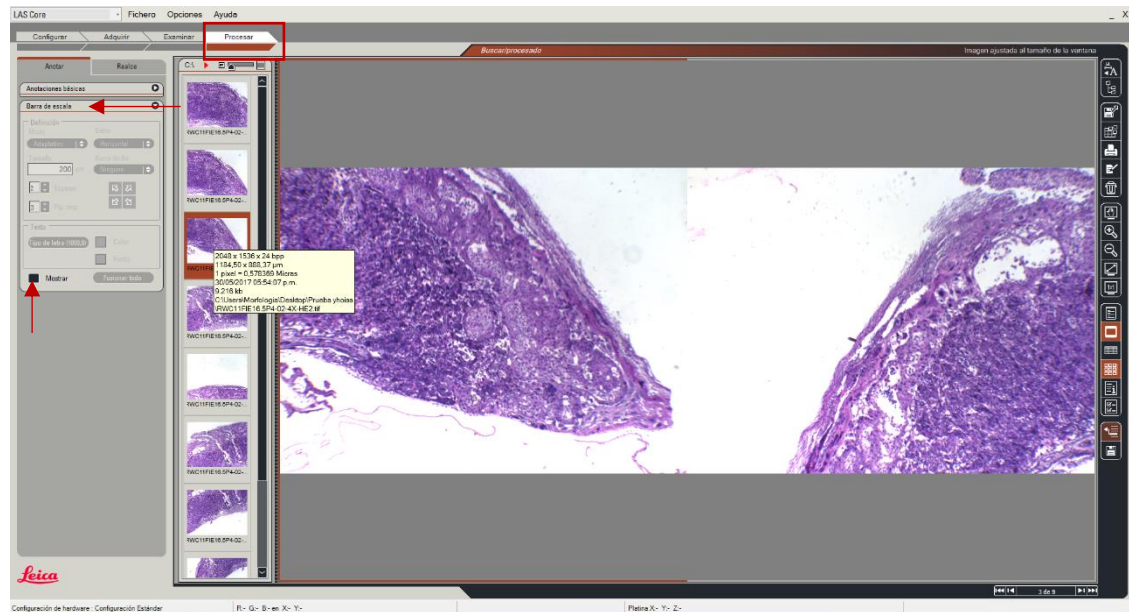


Figura 11: Ruta de acceso a la opción “barra de escala”.

20. En la pestaña de “barra de escala”, seleccionar en “modo”, la opción “longitud de usuario”, luego colocar en “tamaño” la longitud de preferencia (ej: 1000µm), luego ir a “tipo de letra” y ajustar grosor, color y fondo de la línea de referencia (Fig. 12).

21. Luego de ubicar la línea de referencia en la imagen, seleccionar la opción “fusionar todo” y en la ventana que se abre, seleccionar “reemplazar”, de este modo la imagen queda con la regleta de referencia (Fig.13).

Nota: Hay que calibrar la nueva imagen creada, seleccionado la imagen y siguiendo los pasos 16 y 17.

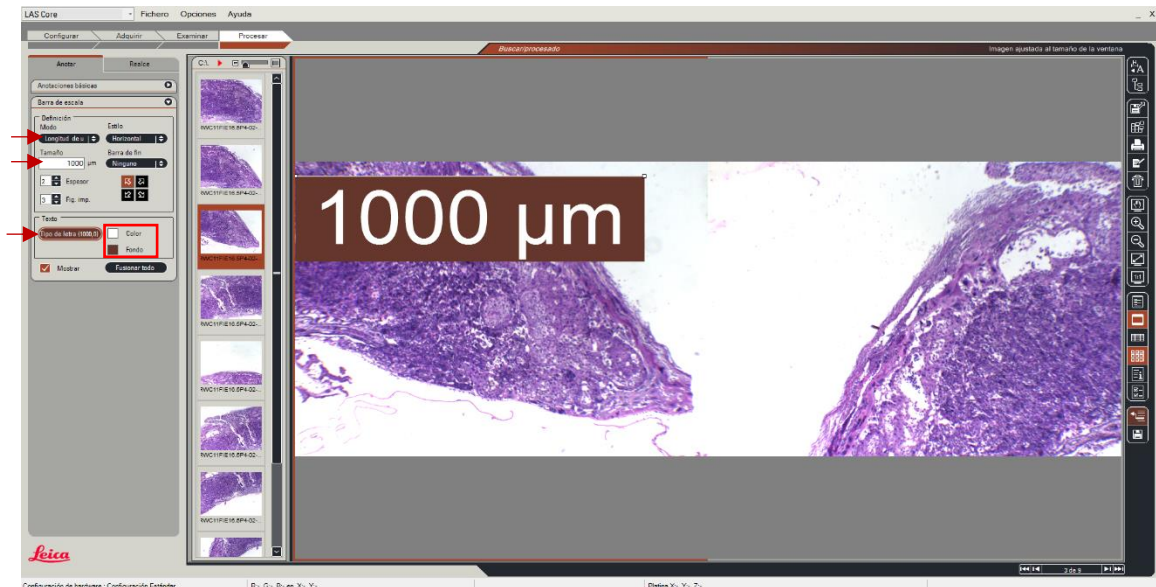


Figura 12: Panel de configuración de la opción “Barra de escala”.

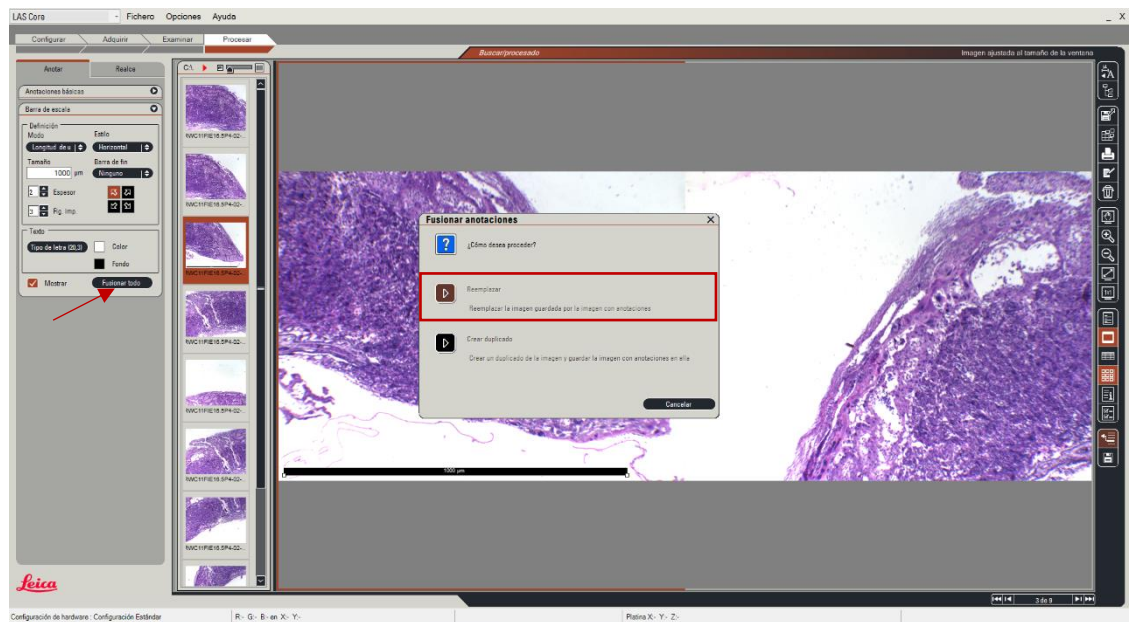


Figura 13: Pasos a seguir para la incorporación de la regla de calibración en la imagen seleccionada.

22. Para generar una sola imagen a partir de varias, ir a la pestaña “examinar”, seleccionar todas las imágenes a unir, seleccionar del panel de la derecha la opción “Combinación de imágenes (stitching)” y finalmente dar clic en el botón

de la parte inferior del cuadro de dialogo, “combinar imágenes (stitching)”, esperar hasta que se genera la imagen (Fig. 14 y 15).

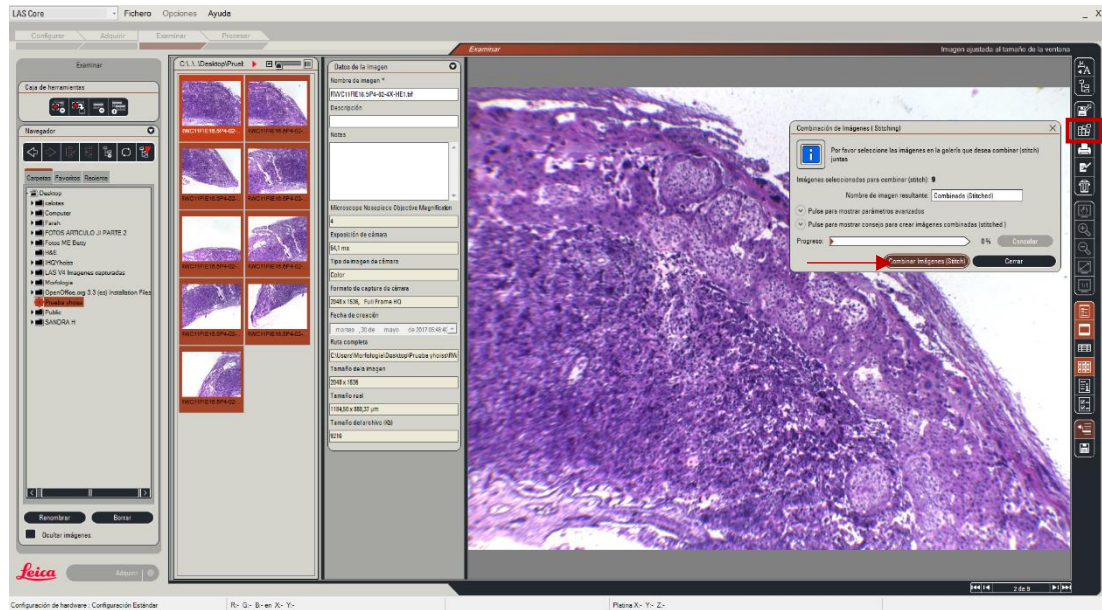


Figura 14: Ruta para la combinación de imágenes.

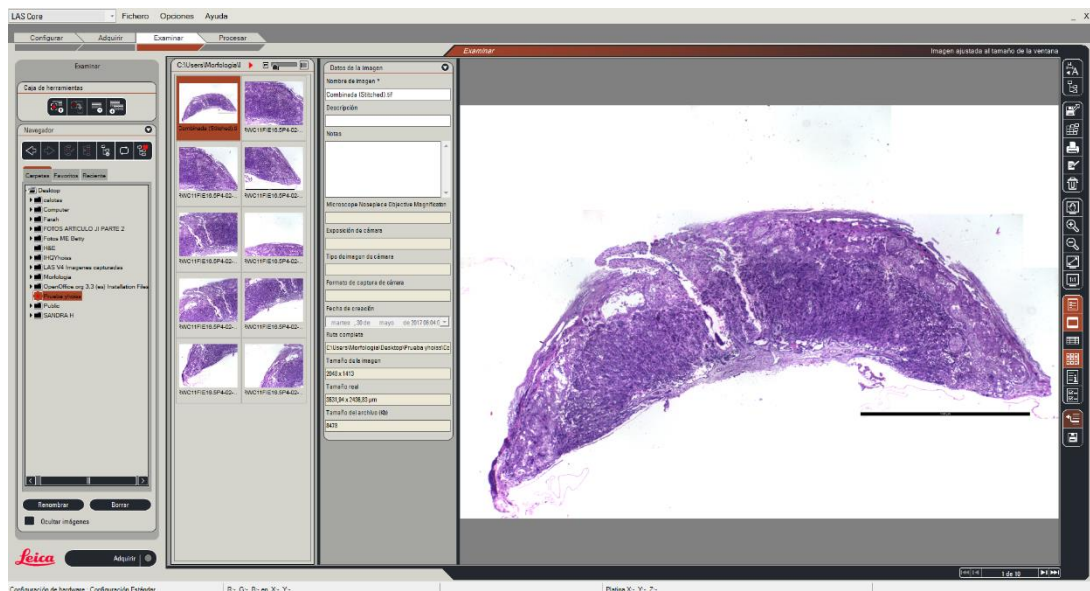


Figura 15: Imagen combinada teñida con hematoxilina-eosina.

Nota: La imagen reconstruida queda guardada en la carpeta previamente seleccionada.

C. Uso de las imágenes reconstruidas

En las imágenes inmunomarcadas reconstruidas, se seleccionan 18 campos de la zona del laberinto, distribuidos en tres niveles equidistantes entre sí y cada nivel con seis campos distribuidos a lo largo del eje mayor: nivel 1, cerca de la zona de unión (ubicación 1, 4, 7, 10, 13 y 16), nivel 2, en la parte central de la zona del laberinto (ubicación 2, 5, 8, 11, 14 y 17), y el nivel 3, cerca de la placa coriónica (ubicación 3, 6, 9, 12, 15 y 18), (Fig. 16). Teniendo en cuenta la ubicación de los 18 campos numerados, se procede a la ubicación de cada campo usando el objetivo de 40x y la posterior captura de la imagen.

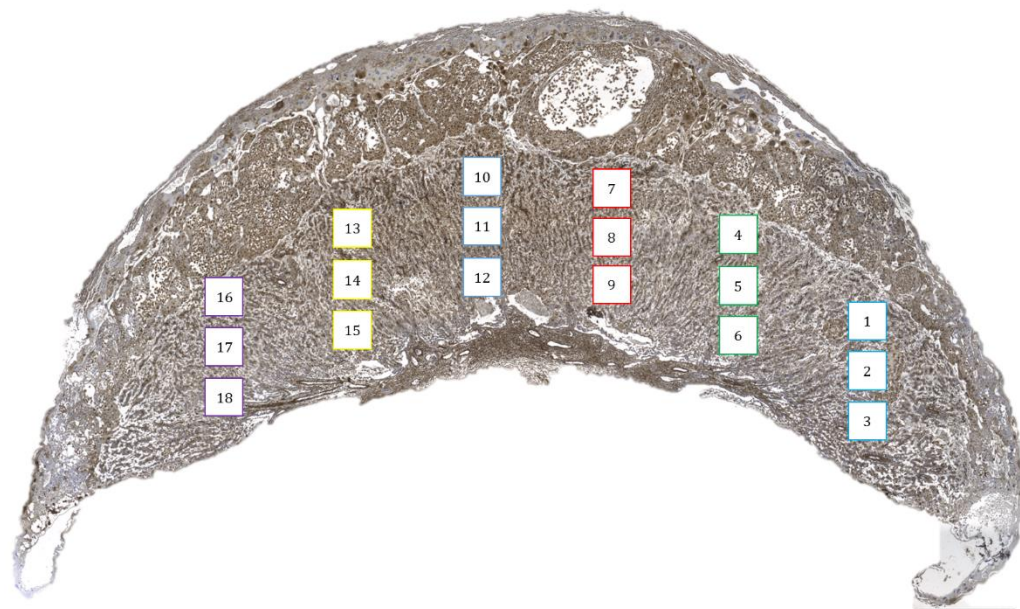


Figura 16: Distribución de los campos en la zona del laberinto de las placentas inmunomarcadas.

Las imágenes capturadas con objetivo de 40x se codifican de acuerdo con el código de la placa y se adiciona el sufijo MU o CU (M= marcada; C= control; U= ubicación), MU, para las muestras inmunomarcadas y CU, para las muestra control (sin anticuerpo primario), seguido de un número del 1 al 18, que corresponde a la ubicación en la zona del laberinto. Las imágenes se codifican según la tabla 1.

Tabla 116. Codificación de las imágenes.

Codificación previa de la placa					Datos agregados a la codificación de la imagen	
<i>Código de la madre (Rata Wistar-RW)</i>	<i>Fase</i>	<i>Edad gestacional</i>	<i>Ubicación en el útero y número de placenta (P=placenta)</i>	<i>Número de la placa</i>	<i>Aumento</i>	<i>Codificación de la inmunomarcación</i>
Grupo Control =RWC # Grupo Obeso =RWO #	FI (uno) FII (dos)	E16.5	P#	01, 02, 03...	4, 10, 40 X	M = Marca C= Control U= Ubicación Consecutivo= 1-18

Ejemplo:

RWO3FIE16.5P6-04-40X-MU1

Adecuación del sitio y elementos de trabajo al finalizar el proceso

El microscopio debe quedar con la intensidad de luz mínima, diafragma del condensador en 4x, objetivo en 4x y apagado. Se debe cerrar la aplicación LASV4.7, retirar las imágenes capturadas del computador y apagar el equipo. Además se debe diligenciar el formato de uso de equipo.

Referencias

Suite L, microscopía S. Detalles [Internet]. Leica-microsystems.com. 2018 [cited 19 June 2018]. Available from: <https://www.leica-microsystems.com/es/productos/software-de-microscopia/detalles/product/leica-application-suite/showcase/>

ANEXO 8: Protocolo para el recuento de vasos fetales en la zona del laberinto

Uso de la herramienta “Multi-point” del software *Image-J*

Introducción

Existen diversos software para el análisis de imágenes, que permiten procesar y obtener información de imágenes capturadas con cámaras acopladas a microscopios. Uno de los software de uso libre utilizado para el análisis de imágenes es el Image-J que proporciona varias herramientas de captura, procesamiento, medida, archivo, análisis, entre otras funciones.

Objetivo

Realizar el recuento de vasos fetales en imágenes de cortes de placentas de biomodelos murinos

Muestra

Imágenes de la zona del laberinto capturadas con objetivo de 40x, provenientes de muestras placentarias inmunomarcadas con Anti-CD31/PECAM1 y α -actina.

Elementos de protección

1. Bata
2. Guantes

Equipos

1. Computador con software a análisis de imagen instalado

Software

1. Image-J

Procedimiento

1. Abrir el programa *Image-J* (Fig. 1).



Figura 1: Icono del programa Image-J

2. Para abrir las imágenes a analizar, se debe seleccionar “File” en la barra superior del Image-J, luego “Open...” (Fig. 2).

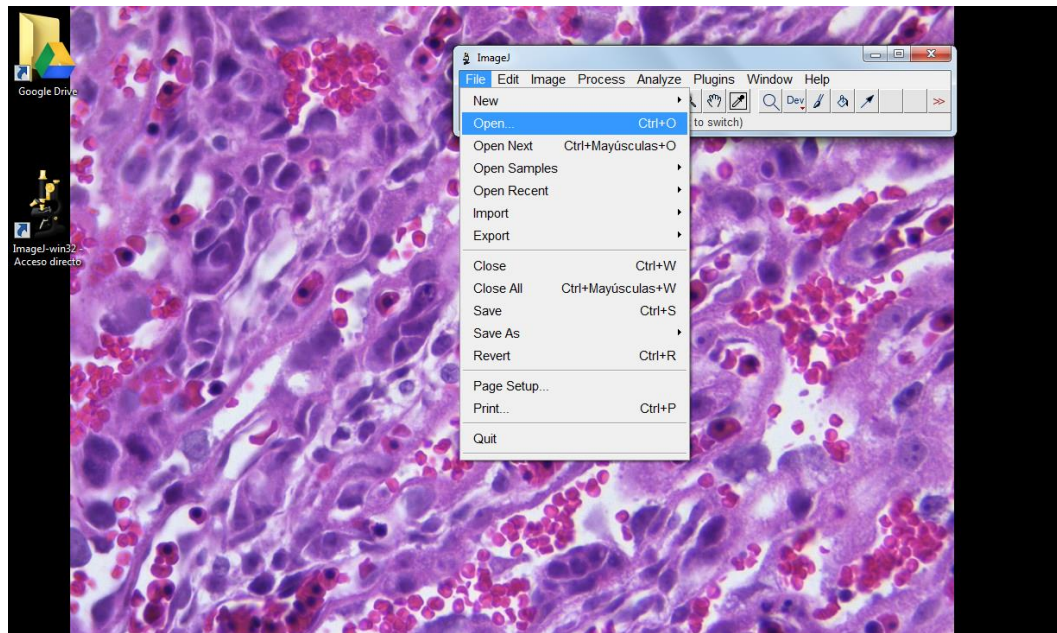


Figura 2: Ruta de acceso para para abrir imágenes desde el programa Image-J.

3. En la ventana “open”, ubicar el archivo de la imagen a analizar y dar clic en “abrir” (Fig. 3).
4. La imagen seleccionada, se abre en una ventana adicional, la cual hay que maximizar (Fig. 4).
5. Se puede usar la herramienta de gradilla para facilitar el recuento. Esta herramienta se debe descargar y se ubica en la pestaña “plugins”, opción “Grid” (Fig. 5).
6. Una vez aparece la gradilla se debe dar clic en “ok”, en el cuadro de diálogo. Para eliminar la gradilla se selecciona de nuevo la opción “Grid” y se da clic en cancelar (Fig. 6).

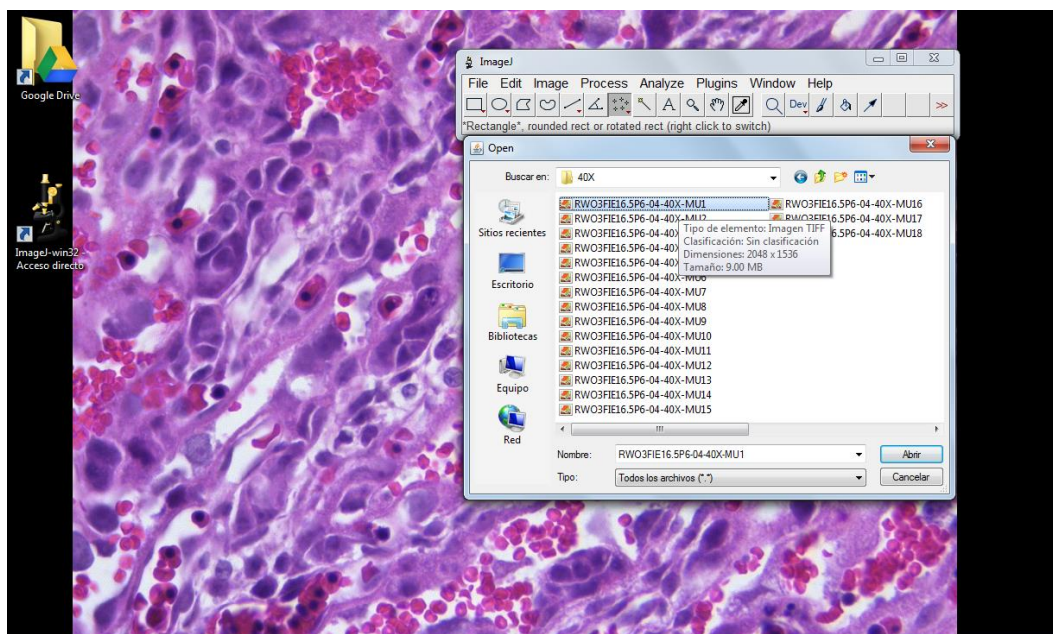


Figura 3: Selección de imagen a analizar.

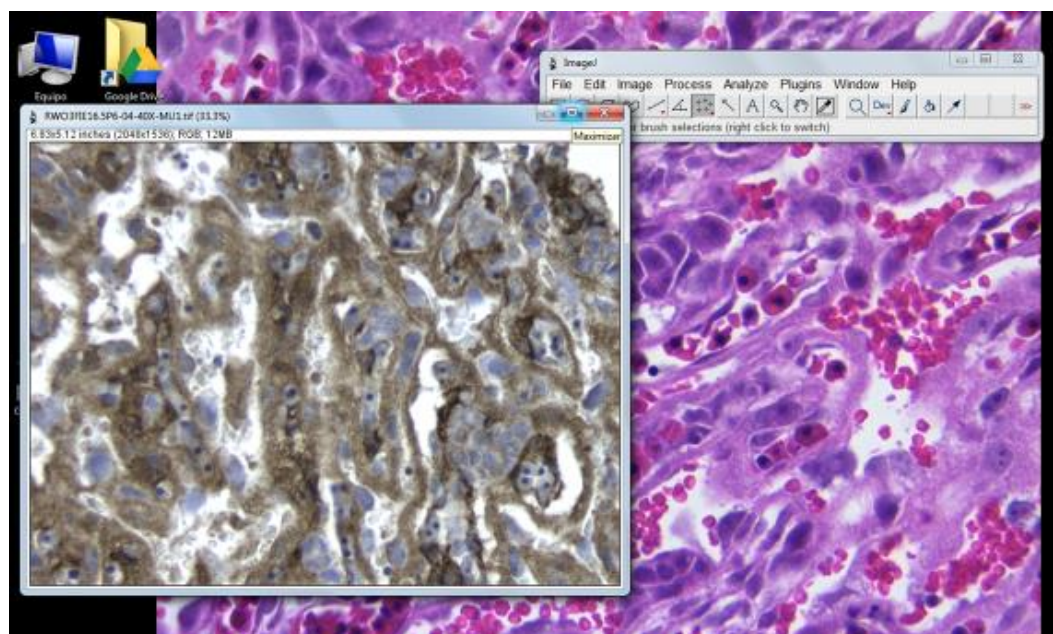


Figura 4: Maximizando la ventana de la imagen a analizar.

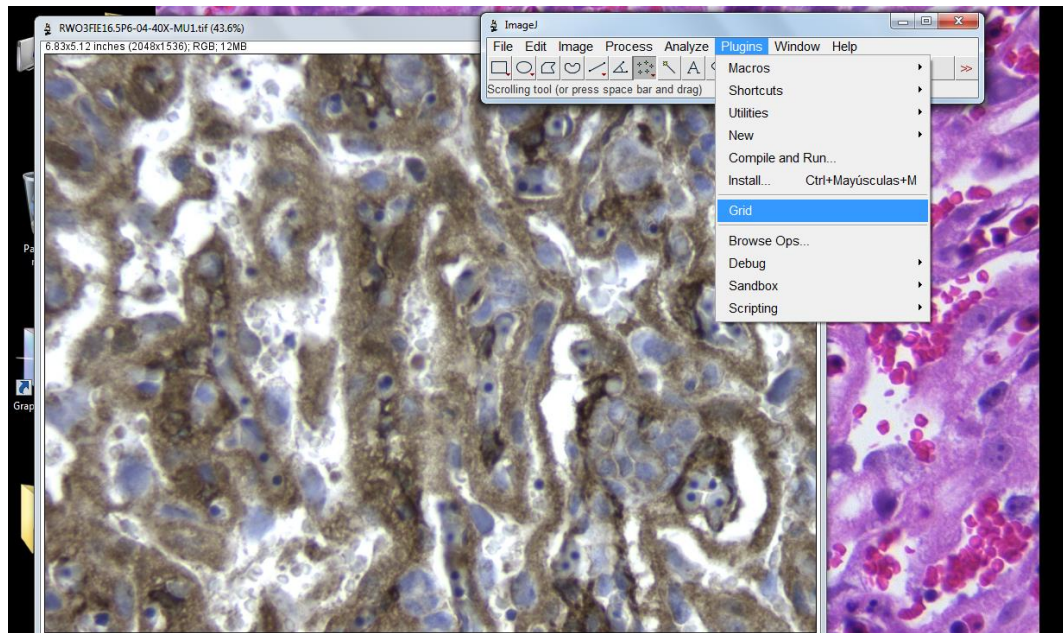


Figura 5: Selección de la gradilla en la opción “Grid”.

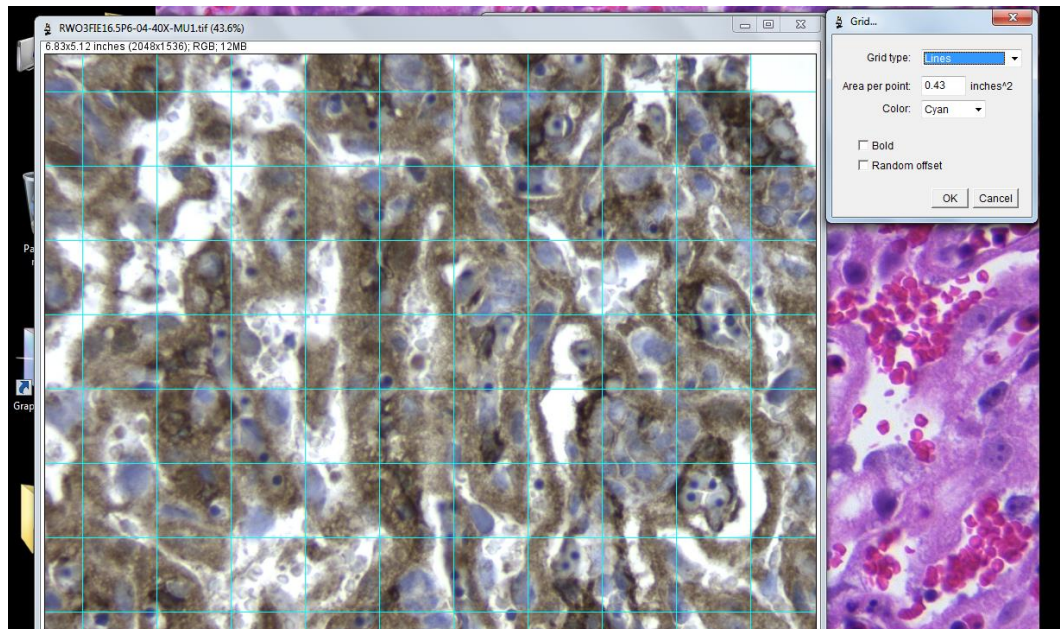


Figura 6: Aparición de la gradilla sobre la imagen a analizar.

7. Para realizar el recuento, seleccionar la opción “Multi-point” dando clic y comenzar el conteo seleccionando los vasos fetales sobre la imagen, según los criterios establecidos previamente. La herramienta coloca puntos numerados al clic sobre la imagen (Fig. 7).

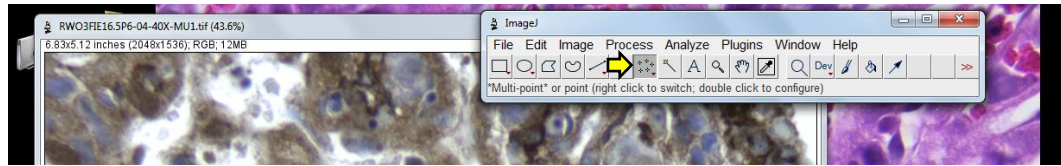


Figura 7: Selección de la herramienta “Multi-point”.

8. Una vez finalizado el recuento, hacer doble clic en la opción “Multi-point” y se abre la ventana “point tool” con la información de la cantidad total de puntos puestos sobre la imagen (Fig. 8).

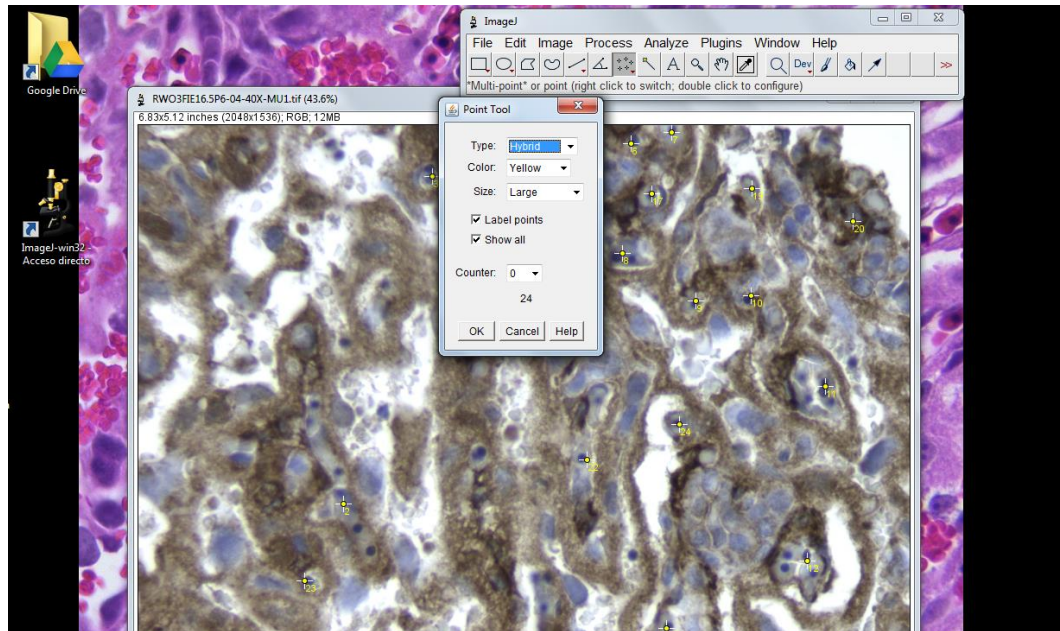


Figura 8: Visualización de la cantidad total de puntos ubicados sobre la imagen en la ventana “Point Tool”.

9. La información de la cantidad de vasos fetales por cada imagen, se registra en Excel para el posterior análisis.

Referencias


Ferreira T. ImageJ User Guide - IJ 1.46r [Internet]. Imagej.nih.gov. 2018 [cited 18 June 2018]. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/index.html>

DIVULGACIÓN

Los resultados de esta investigación se prestaron en los siguientes eventos:

1. XVI Simposio de Investigaciones en Salud. “Ciudades saludables”. 22 y 23 de octubre de 2014. Universidad del Valle. Cali, Colombia. “Perfil bioquímico de un modelo de obesidad inducido por dieta”. E-poster.



- 

La placenta de rata Wistar como modelo de estudio

Yhoiss Smith Muñoz, Liliann Salazar, María Carolina Puatovich
Departamento de Morfología, Universidad del Valle, Santiago de Cali

Introducción

Resultados

La rata es uno de los biomodelos más usados para el estudio de placentación. En estos murinos la formación de la placenta inicia poco después de la implantación del blastocisto y adquiere su estructura definitiva al día 15 de gestación, sin embargo continúa su remodelación hasta el final de la gestación.

La placenta de los murinos consta de 4 zonas: la zona del laberinto, la zona de unión, la decidua y el triángulo menial. Cada una de ellas identificables morfológicamente por técnicas histológicas.

La placenta de 16.5 días de gestación, se compone de cuatro zonas, detalladas desde la cara fetal hacia la cara materna, corresponden a: zona de laberinto, zona de unión, decidua y triángulo menial. Se hará la descripción de las dos primeras zonas (fig. 1).

Objetivo

Resultados

Describir la estructura histológica de placenta madura de la rata Wistar

La placenta de 16.5 días de gestación, se compone de cuatro zonas, detalladas desde la cara fetal hacia la cara materna, corresponden a: zona de laberinto, zona de unión, decidua y triángulo menial. Se hará la descripción de las dos primeras zonas (fig. 1).

Metodología

Resultados

Estudio descriptivo.

Biomodelo preñado de 16.5 días. Previa anestesia fue sacrificado, se realizó la disección del útero y la obtención de las placentas. Una placenta fue seleccionada y procesada para histología. Se tomaron fotografías secadas en microscopio de luz (Leica DM750).

La zona de laberinto compuesta por la placa coriónica, presenta vasos fetales, vellosidades y lagunas (fig 2a y 2b). La zona unión la constituyen tres tipos celulares, espongiotrofoblastos, las células glucogénicas y las células gigantes trofoblasticas (fig 2c y 2d).

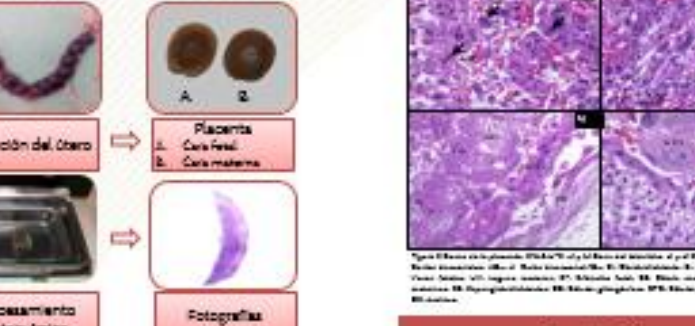


Diagrama de flujo de la metodología:

 - Disección del útero
 - Placenta (Cara fetal, Cara materna)
 - Procesamiento histológico
 - Fotografías

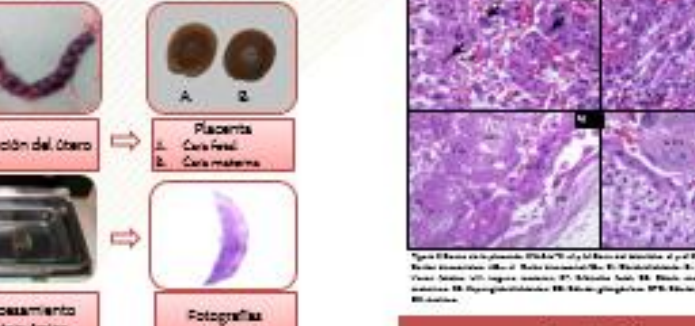



Figura 1: Placenta de rata Wistar a los 16.5 días de gestación. Se muestran cuatro imágenes histológicas: A) Zona de laberinto, B) Zona de unión, C) Decidua, D) Triángulo menial.

Figura 1. Metodología empleada en la placenta



teblami

teblami

El conocimiento de la estructura histológica básica de la placenta madura de rata constituye una base para investigaciones en procesos de enfermedad que involucran empleo de biomodelos.

3. XVIII Simposio de Investigaciones en Salud. “Universidad, salud y posconflicto”. 25-27 de octubre de 2016. Universidad del Valle. Cali, Colombia. “Descripción histológica de la placenta madura de rata Wistar”. Ponencia oral.



4. XIII Congreso Colombiano de Morfología. 23-25 de Noviembre del 2017. Universidad del Norte, Barranquilla. Colombia. “Caracterización histo-morfométrica de la placenta de rata Wistar”. Ponencia oral.



5. XXV Reunión bienal de la asociación latinoamericana de investigadores en reproducción humana- ALIRH. 20-24 de Noviembre del 2017. Universidad del Norte, Barranquilla. Colombia. "Caracterización morfológica de placentas provenientes de ratas con obesidad pregestacional adquirida por dieta de cafetería". Póster.

